

**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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mere Erika Saito.

Coorientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque.

**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. Urinálisc. 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.itd.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.itd.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.itd.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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, aconchegante 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<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. Julieta Volpato e Dr<sup>a</sup>. 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 complicações marcadas 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  $O_3$  subcutâneo (TO3), tratamento com  $O_3$  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  $\mu$ g/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia*, apesar do aparecimento de lesões dermonecróticas, 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 dermonecróticas 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  $\mu$ g/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 dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5 $\mu$ g/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo controle positivo (CP)..... 31
- Figura 2 – Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5 $\mu$ g/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3)..... 31
- Figura 3 – Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5 $\mu$ g/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com O<sub>3</sub> subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt)..... 32
- Figura 4 - Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5 $\mu$ g/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com pomada de tetraciclina (Tpt)..... 32
- Figura 5 - Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5 $\mu$ g/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com óleo ozonizado (Tol)..... 33
- Figura 6 - Avaliação da área da lesão em cm<sup>2</sup> de coelhos, submetidos experimentalmente pela peçonha de *Loxosceles intermedia*, comparando os grupos controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), tratamento com O<sub>3</sub> 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 O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), tratamento com O<sub>3</sub> 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 O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), com O<sub>3</sub> 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 O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), com O<sub>3</sub> 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 <sub>3</sub>	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

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
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
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
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
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
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
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Acidentes infligidos por espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* sp. podem desencadear quadro clínico grave, sendo eles cutâneo, cutâneo-visceral ou sistêmico (ISBISTER; FAN, 2011). O gênero *Loxosceles* sp., possui 139 espécies descritas em todo o mundo (MAGALHÃES et al., 2017). Os acidentes envolvendo esse gênero são relatados com maior frequência em zonas tropicais e subtropicais, as espécies mais comuns de importância médica são *Loxosceles laeta*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles gaucho*; e que são popularmente conhecidas como aranha-marrom (MAGALHÃES et al., 2017; FINGERMANN et al., 2020).

Os indivíduos destas espécies de *Loxosceles* possuem coloração marrom-clara a escura, com seis pares de olhos dispostos em um padrão característico de três pares e pernas relativamente longas e finas. Eles compartilham uma marca distinta que lembra um violino no lado dorsal do cefalotórax (MAGALHÃES et al., 2017).

Os acidentes causados por essas aranhas são chamados de loxoscelismo, ocorrem frequentemente de forma intra ou peridomiciliares. Apesar da ampla distribuição da espécie, casos clínicos de picada de aranha *Loxosceles* sp. são mais comumente relatados nas Américas, especialmente no Brasil (OLIVEIRA-MENDES et al., 2020). O loxoscelismo representa um problema de saúde pública no Brasil, onde as aranhas-marrons são responsáveis pela maioria de todos os acidentes com aranhas notificados pelo Ministério da Saúde, com cerca de 8.000 casos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Entre os anos de 2017 e 2021 após levantamento epidemiológico, dentre as aranhas identificadas, o acidente loxoscélico foi o mais comum, com 39.409 (23,40%) dos acidentes em todo o Brasil. No período de 2020 e 2021, em meio à pandemia de covid-19, houve uma redução no número de registros de acidentes por aranhas, as notificações dos acidentes loxocélicos foram 7224 e 6513 respectivamente, talvez pela maior preocupação com a limpeza doméstica e receio de exposição ao SARS-CoV-2 na busca de hospitais (BRASIL, 2022).

Enquanto o loxoscelismo cutâneo é caracterizado por dermonecrose, que geralmente cicatriza em semanas, o loxoscelismo sistêmico é uma complicação marcada por hemólise e coagulopatia disseminadas e pode levar à morte em alguns casos (ISBISTER; FAN, 2011; ROBINSON et al., 2017). O veneno das aranhas-marrons tem como seu principal componente a fosfolipase D, que promove agregação, adesão e ativação de plaquetas (TAVARES et al., 2011). As plaquetas são cruciais para a maquinaria hemostática e sua regulação, possuem papéis

fisiopatológicos importantes, presentes na coagulação, resposta inflamatória e imunológica (GARRAUD et al., 2013). No entanto, são pouco estudados nos processos fisiológicos como no loxoscelismo cutâneo e visceral, assim como o mecanismo fisiopatológico hemostático (SHARMA et al., 2014).

A diminuição da contagem de plaquetas e dermonecrose resultantes de picadas de *Loxosceles sp.* foram relatadas em humanos (LEVIN et al., 2013). Tavares et al. (2015) observaram que os animais trombocitopênicos desenvolveram um quadro mais grave no estágio inicial, progressão e resolução da lesão dermonecrótica, induzida pelo veneno de *Loxosceles sp.* Assim, sugerem que as plaquetas têm um papel protetor durante o desenvolvimento da lesão dermonecrótica induzida por esse veneno de aranha. O presente estudo possui como um dos objetivos relacionar os possíveis distúrbios hemostáticos nos animais inoculados com a peçonha de aranhas-marrons em diferentes tratamentos, avaliando as plaquetas morfologicamente durante microscopia e o seu número total, para compreender o papel das plaquetas no loxoscelismo cutâneo-visceral.

Os mecanismos fisiopatológicos específicos da peçonha são multifatoriais e não estão totalmente esclarecidos (TAMBOURGI et al., 2005; DELASOTTA et al., 2014). Dessa maneira são necessários estudos que esclareçam as alterações fisiológicas ocorridas no loxoscelismo cutâneo-visceral em coelhos.

Os protocolos de tratamento propostos para acidentes de aranha-marrom incluem basicamente corticosteroides, pomadas com antibióticos e soro antiloxoscelico (DELASOTTA et al., 2014). A eficácia do soro antiaracnídico em neutralizar os efeitos locais variam em diferentes abordagens terapêuticas, especialmente para a lesão de pele (ISBISTER; FAN, 2011). A tentativa de tratamento tópico inclui pomada de colagenase e metilprednisolona; sulfadiazina de prata (TRAVE; BARABINO; PARODI, 2020); ou mupirocina, muitas vezes sem sucesso no avanço da lesão. Em muitas situações a dermonecrose é tão extensa que requer enxertos de pele (DELASOTTA et al., 2014).

As estratégias empregadas para tratar lesões de pele incluem diversas terapias integrativas. Atualmente a fitoterapia e ozonioterapia vêm sendo estudadas como opções, obtendo sucesso na cicatrização de feridas causadas por diferentes peçonhas (OLIVEIRA et al., 2014; RICARDO et al., 2018). A ozonioterapia é uma terapia integrativa baseada no uso de uma mistura gasosa de oxigênio e ozônio medicinal (BOCCI, 2004). Apresentando efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, bactericidas, fungicidas, viricidas e melhora na perfusão tecidual, dessa forma, sua aplicação dentro da Medicina Humana e Medicina Veterinária vem ganhando

espaço. Na medicina veterinária é utilizada principalmente no tratamento de afecções dermatológicas, oculares e ortopédicas (BOCCI, 2004; ANZOLIN; BERTOL, 2018).

No presente estudo foram avaliados os efeitos da inoculação da peçonha de *L. intermedia* em coelhos da raça Nova Zelândia sobre os parâmetros hematológico, bioquímico, hemostático e urinário, conforme a progressão do loxoscelismo em diferentes grupos de animais utilizando tratamentos com e sem ozonioterapia e em animais controle.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hemostasia

Hemostasia é a suspensão de sangramento ou a interrupção do fluxo sanguíneo através de um vaso (STOCKHAM; SCOTT, 2011). A hemostasia atua por meio de mecanismos constantes e estritos de manutenção da homeostase no organismo, tem por função primordial a manutenção da fluidez sanguínea (principal propriedade do sangue), permitindo sua caracterização como um líquido com viscosidade variável. A fluidez sanguínea proporciona permissividade de fluxo sanguíneo pelos leitos vasculares possibilitando o carreamento de substratos e catabólicos para o adequado funcionamento celular e orgânico (GUYTON; HALL, 2006).

O sistema hemostático também é responsável pela interrupção do fluxo sanguíneo para o meio extravascular em processos hemorrágicos, utilizando-se da formação de tampões hemostáticos através da coagulação (THRALL, 2007). A dissolução posterior dos coágulos formados é realizada pelo sistema fibrinolítico, possibilitando a reperfusão sanguínea do tecido irrigado pela vasculatura acometida (GUYTON; HALL, 2006).

A coagulação envolve uma série interconectada de etapas de ativação enzimática que formam trombina (fator IIa) e convertem fibrinogênio solúvel (fator I) em um tampão de fibrina insolúvel chamado tampão hemostático secundário. A cascata da coagulação pode ser dividida em três vias, que podem ser avaliadas separadamente *in vitro* (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

### 2.1.1 Hemostasia primária

A partir de uma injúria, o vaso lesionado sofre vasoconstrição reduzindo a perda sanguínea, células endoteliais são ativadas limitando o sangramento e a coagulação, em seguida, as plaquetas se aderem ao endotélio exposto, interagindo com o local da lesão, se agregando, formando o tampão hemostático primário com as demais plaquetas ativadas (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A alteração estrutural do endotélio promove a modificação de sua característica antitrombótica, por meio da mudança de sua carga negativa superficial e pela exposição para o meio intravascular de moléculas subendoteliais pró-coagulantes, como o fator de von Willebrand (fvW), colágeno, fibroblastos e o fator tecidual (TRIPLETT, 2000).

É observada concomitantemente aos eventos da hemostasia primária, a síntese local de pequenas quantidades de trombina. Por meio da ação enzimática da trombina para a formação da fibrina a partir do fibrinogênio (evento primordial), a hemostasia secundária tem por finalidade, promover a formação local do coágulo estável de fibrina (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

### 2.1.2 Hemostasia secundária

A hemostasia secundária consiste na coagulação sanguínea. O objetivo da coagulação é a geração de trombina, que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. Então as moléculas de fibrina formam ligações cruzadas, resultando em uma malha que estabiliza o tampão plaquetário formado na hemostasia primária. A formação de trombina é o produto de uma cascata de reações enzimáticas iniciada pelo trauma tissular e liberação do fator tecidual (DAY et al., 2001).

A cascata da coagulação começa com ativação das vias do fator tecidual (FT) (extrínseca) ou induzida pela superfície (intrínseca) e resulta na formação de fibrina (fibrina estável) pela via comum, iniciando com o fator X (BOUDREAUX, 2010).

Via do fator tecidual (FT): Originalmente, pensava-se que esta via exigia ativação extravascular e por isso foi denominada extrínseca. É iniciada pelo FT liberado de tecido lesado ou exposto a monócitos, macrófagos e células endoteliais ativadas. Tais células podem ser ativadas por endotoxinas e citocinas inflamatórias (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

O FT da membrana celular liga-se ao fator VII (e VIIa) na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , e o complexo FT-VIIa ativado resultante rapidamente ativa o fator X (via comum) e o fator IX (via induzida pela superfície) na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolipídio. A trombina ativa o fator XI e a amplificação dos pró-cofatores V e VIII para manter a produção de fator Xa pela via induzida pela superfície. A maioria dos processos de ativação dos fatores de coagulação ocorre nas membranas fosfolipídicas das plaquetas sob auxílio do cálcio ionizado (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A Via induzida pela superfície originalmente, era considerada a via ativada por fatores intravasculares (intrínsecos), é iniciada a partir da ativação do zimogênio (enzima inativa sintetizada nos hepatócitos) chamado fator de Hageman ou Fator XII (FXII) da coagulação (LICARI; KOVACIC, 2009; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

O contato do FXII com superfícies endoteliais lesionadas, que sofrem modificações conformacionais acrescido à exposição de moléculas pró-coagulantes, promove sua ativação e formação da enzima FXIIa. O fator FXIIa promove, com auxílio de outras substâncias como a calicreína e bradicinina, a ativação de outro zimogênio, o fator XI em fator XIa, o qual, por sua vez, promove a ativação do fator IX em IXa (RIDDEL et al., 2007).

### 2.1.3 Via comum

Via comum é a continuação das vias do FT e induzida pela superfície, a partir deste ponto a coagulação desenvolve-se de maneira igualitária (MACKMAN; TILLEY; KEY, 2007).

Começando com ativação do fator X. O fator Xa forma um complexo com o fator Va (ativado principalmente pela trombina) e o  $\text{Ca}^{2+}$  em uma superfície fosfolipídica para formar o complexo pró-trombinase ativo, que resulta na conversão enzimática de protrombina (fator II) em trombina (fator IIa) (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A trombina promove a formação de monômeros solúveis de fibrina a partir do fibrinogênio sérico, sendo a conversão da fibrina em uma malha ou rede insolúvel (interpostas em ligações cruzadas) realizada por meio do fator XIIIa (LICARI; KOVACIC, 2009).

Pró-cofatores proteicos (fatores V e VIII) promovem ativação do cofator e acelera a coagulação e a Proteína C (PCA), a mesma inativa os fatores Va e VIIIa, e promove fibrinólise (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

## 2.2 Testes de coagulação

Os testes de coagulação são úteis no diagnóstico de distúrbios de coagulação e no monitoramento da terapia anticoagulante. O tempo de protrombina (TP), o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e a concentração de fibrinogênio em amostras de plasma colhidos em citrato, são testes de triagem amplamente utilizados no cenário clínico para avaliação do perfil de coagulação (PICCIONE, 2010).

Embora os diagnósticos de coagulação modernos estejam se tornando cada vez mais complexos, TP e TTPA ainda são importantes e refletem a atividade de vários fatores de coagulação dos sistemas extrínseco e intrínseco (PICCIONE, 2010).

Acidentes em humanos causados por aranhas *Loxosceles sp.* podem resultar em alguns casos, reações sistêmicas graves, entre elas, coagulação intravascular disseminada (CID), insuficiência renal e morte. Como alguns aspectos da fisiopatologia dos acidentes ocasionados pelo gênero de aranha *Loxosceles sp.* não são totalmente elucidados, torna-se essencial o estudo das respostas hemostáticas ao veneno de *Loxosceles sp.* em modelos experimentais, como em coelhos (TAVARES et al., 2015).

Estudos anteriores utilizando metodologia semelhante ao apresentado neste trabalho, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimental e controle nos valores de TP e do TTPA, mostrando que o sistema de coagulação estava funcionando normalmente, descartando a possibilidade de alterações sistêmicas na coagulação sanguínea. (TAVARES et al, 2004; TAVARES et al., 2015).

## 2.3 Hematologia

O sangue transporta as substâncias e os elementos necessários à vida. Os eritrócitos, parte principal do sangue são produzidos principalmente na medula óssea (eritropoiese), sendo que sua quantidade é dependente de mudanças no volume plasmático, destruição ou perda, contração esplênica, secreção de eritropoetina (GARCIA-NAVARRO, 2005).

Os eritrócitos são as células responsáveis pelo transporte do oxigênio até os tecidos, graças às moléculas de hemoglobina dispersas em seu citoplasma (HOFFBRAND, 2013). O exame hematológico é uma ferramenta que permite, de maneira fácil, a obtenção de informações valiosas sobre a saúde do animal (GARCIA-NAVARRO, 2005).

O hemograma é o exame de triagem mais solicitado por ser minimamente invasivo, pela sua rapidez, e baixo custo em relação as informações importantes que fornece sobre o estado geral do paciente. Tais informações, aliadas ao histórico clínico e ao exame físico do animal, possibilitam o diagnóstico de inúmeras enfermidades. É didaticamente dividido em eritrograma, leucograma e plaquetograma (HARRIS, 2009) é composto por avaliações qualitativas e quantitativas dos elementos sanguíneos (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Determinadas alterações morfológicas apresentam significado clínico relevante, justificando a importância da avaliação microscópica dos esfregaços sanguíneos corados, tanto destas células, quanto das demais. Para tanto, a experiência do analisador deve ser levada em consideração (HOFFBRAND, 2013).

A hemoglobina é uma proteína (ferro-porfirina). Essa molécula ocupa um papel fundamental na fisiologia, pois sua estrutura é um tetrâmero com cada globina ligada a um heme separada que se liga ao oxigênio. É responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

O leucograma é o conjunto de valores quantitativos, tanto relativo quanto absoluto, associado às informações morfológicas dos mesmos. Os leucócitos são células de defesa, envolvidos em diversos processos fisiológicos, produzidos constantemente na medula óssea. São divididos em dois grupos principais, os polimorfonucleares (heterófilos, no caso de coelhos, eosinófilos e basófilos) e os mononucleares (linfócitos e monócitos), apresentando funções distintas e específicas, auxiliando na interpretação dos exames laboratoriais (HOFFBRAND, 2013).

O plaquetograma é a parte do hemograma que expressa a quantidade total de plaquetas por  $\mu\text{L}$ , além de observações pertinentes à sua morfologia e distribuição no esfregaço sanguíneo (BOMMER et al., 2008). As plaquetas são resquícios citoplasmáticos do megacariócito, uma célula pluripotente de origem medular. São caracterizadas pela ausência de núcleo e pode conter grânulos em seu interior (HOFFBRAND, 2013). A produção dessas células e manutenção das quantidades na circulação é controlada pelo hormônio trombopoietina. São responsáveis pela hemostasia primária, formando o tampão plaquetário, na tentativa de impedir a saída do sangue dos vasos sanguíneos, até que a hemostasia secundária seja concluída (BOMMER et al., 2008).

Durante o loxoscelismo cutâneo ou viscerocutâneo, alterações precoces nos parâmetros hematológicos e hemostáticos são muito difíceis de acompanhar em acidentes humanos, pois muitos pacientes procuram atendimento médico mais de 48 horas após a picada (MALAQUE, 2011).

Em análise de 81 pacientes humanos diagnosticados com loxoscelismo cutâneo ou cutâneo-hemolítico, foram avaliados os dados clínicos e laboratoriais obtidos durante a semana 1 e 2 após a picada. Foi observado hemólise maciça em apenas 2 casos. A anemia não foi frequente, e observado em 14,7% dos pacientes. A febre foi associada à presença de hemólise (MALAQUE, 2011).

#### 2.4 Bioquímica

A bioquímica sérica reflete a situação metabólica dos tecidos de forma a permitir a avaliação de lesões teciduais, transtornos no funcionamento dos órgãos, adaptação a desafios fisiológicos e transtornos metabólicos específicos (KANEKO et al., 2008).

A análise quantitativa desses compostos aliados aos valores de referências adequados (espécie, idade, sexo, região) contribui com a avaliação clínica, nutricional e metabólica dos animais. Tais informações auxiliam no diagnóstico de diversas patologias de forma prática, rápida e econômica, desde que associadas à anamnese e exame físico do animal. São inúmeros os metabólitos que podem ser mensurados no soro/plasma sanguíneo (KANEKO et al., 2008).

Para o auxílio do diagnóstico de loxoscelismo em humanos, sugere-se hemograma completo, urinálise, e análise bioquímica contendo bilirrubinas total e frações, fosfatase alcalina, ALT e AST, desidrogenase lática, creatinofosfoquinase, ureia e creatinina (MALAQUE et al., 2011).

#### 2.5 Urinálise

A urinálise é um procedimento rápido e fácil que pode fornecer informação valiosa do sistema urinário, além de avaliar outros órgãos como o pâncreas e o fígado, direcionando assim o médico veterinário ao diagnóstico correto. Fornece ainda informações iniciais sobre distúrbios tais como hemorragia glomerular, hepatopatias, alterações metabólicas e infecções do trato urinário (MELILLO, 2007).

A amostra da urina de coelhos pode ser obtida através da micção espontânea, por cistocentese, procedimento menos utilizado, visto a necessidade de sedação/anestesia, e por compressão vesical, avaliando o potencial risco de rompimento vesical, já que a parede da bexiga dos coelhos é delgada, especialmente nos casos de obstrução (MELILLO, 2007).

O exame de urina se divide em três etapas, o exame físico, químico e análise do sedimento. Para a avaliação de urina no presente estudo foi realizado urinálise completa semelhante ao utilizado em espécies domésticas convencionais, além de avaliar a Relação proteína creatinina urinária (RPCU) utilizado como padrão na avaliação de lesão glomerular (JENKINS, 2008).

Em humanos sabe-se que insuficiência renal aguda é a principal complicaçāo que pode levar à morte no loxoscelismo. Lopes et al. (2020) em seu estudo de revisão bibliográfica, revisou 120 relatos de casos notificados de loxoscelismo, publicados em artigos de 2000 a 2020, das alterações relacionadas ao sistema urinário, verificou-se aproximadamente 14% de casos de insuficiência renal aguda, com aumento dos níveis de uréia e creatinina, oligúria e/ou anúria e 14% de pacientes diagnosticados com anemia hemolítica, com alterações na hemoglobina e bilirrubina, apresentando hemoglobinúria, indicando a importância de exames laboratoriais para monitorar, as características sistêmicas do loxoscelismo.

## 2.6 Ozonioterapia

O ozônio ( $O_3$ ) é um componente natural da atmosfera, na estratosfera o  $O_3$  forma uma camada indispensável que nos protege das radiações ultravioleta, na troposfera,  $O_3$  é considerado um poluente obtido a partir da reação entre os óxidos de nitrogênio, liberados de fontes poluidoras como a fumaça de automóveis (HÄNNINEN, 2019).

Apesar de ser conhecido pelo seu papel como poluente, o  $O_3$  é utilizado na medicina humana e veterinária como uma mistura gasosa de  $O_3$  e  $O_2$  chamada de ozonioterapia, baseia-se na dissociação rápida do  $O_3$  em água e libera uma forma reativa de oxigênio que pode oxidar as células, preferencialmente microrganismos indesejáveis. Essa dissociação aumenta a disponibilidade de oxigênio e ATP para a atividade celular (CASE et al., 2012)

O ozônio foi originalmente aplicado na medicina de maneira empírica nos últimos 200 anos desde o primeiro relato de esterilização em 1826. Há relatos de uso como molécula microbicida desse período para desinfetar salas de cirurgia e tratamento de água (TRAVAGLI et al., 2007). Estudos revelaram outras atividades importantes, como suas funções antioxidantes e anti-inflamatórias, e seu efeito imunoestimulante (TRAVAGLI et al., 2007; ELVIS; EKTA, 2011).

As preparações médicas com ozônio foram classificadas principalmente como hidroterapia com ozônio, óleo ozonizado e auto-hemoterapia com ozônio. O  $O_3$ , para

aplicações relacionadas à medicina humana, é usado no tratamento de várias doenças como, artrite, asma, câncer, hepatopatias, uveíte, cistite, osteomielite, sepse, sinusite, infecções da cavidade oral, entre outras (ALMAZ; SÖNMEZ, 2015; BORGES et al., 2017).

Tem sido usado principalmente no tratamento de doenças dermatológicas infecciosas como, herpes zoster, abscesso e pé de atleta (TRAVAGLI et al., 2007); doenças alérgicas, dermatite atópica, eczema e urticária (JENEROWICZ, 2012); doenças de eritema escamoso, como psoríase e pústula palmo plantar (GERSHWIN, 2015); cicatrização de feridas e recuperação de úlceras (BOCCI, 2015).

Na Medicina Veterinária vem ganhando espaço e é utilizada principalmente no tratamento de afecções dermatológicas (ação antimicrobiana e cicatrização de feridas), ortopédicas e oculares (ORLANDIN et al., 2021).

A única via impraticável para aplicação médica de O<sub>3</sub> é a inalação devido à sua toxicidade pulmonar. Rinite, tosse, dor de cabeça e, às vezes, náuseas e vômitos são os efeitos colaterais típicos da terapia com O<sub>3</sub>. O O<sub>3</sub> não deve ser administrado em algumas condições, como gestação, favismo, hipertireoidismo, miastenia grave e anemia (SCIORSCI, 2020).

Os mecanismos de ação do ozônio têm envolvimento no efeito antimicrobiano direto, imunorregulação, defesas antioxidantes, modificação epigenética, efeitos bioativos, analgésicos e vasodilatadores. Existem vários indícios para seu efeito antimicrobiano, em primeiro lugar o ozônio interrompe diretamente o ácido nucleico ou o invólucro lipossômico de microrganismos, depois que a membrana é danificada, a permeabilidade aumenta e as moléculas de ozônio podem entrar facilmente nas células (BORGES et al., 2017). Além disso, gera reações de nível molecular no meio onde libera radicais livres de oxigênio e, indiretamente, destrói o microambiente vivo (SCIORSCI, 2020).

A imunorregulação do ozônio no tratamento de doenças é, geralmente, aumentando a quantidade de leucócitos, aumentando a capacidade fagocitária dos granulócitos, facilitando a formação de monócitos e ativando as células T. Simultaneamente, aumenta a liberação de citocinas, como interferon e interleucina (BORGES et al., 2017; SCIORSCI, 2020).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Verificação da influência local e sistêmica de diferentes tratamentos de coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) inoculados com peçonha de *L. intermedia*.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

Avaliar a progressão das lesões de pele em coelhos relacionando com o tratamento com ozonioterapia perilesional, pomada de tetraciclina 5% e óleo ozonizado.

Relacionar os possíveis distúrbios hemostáticos, hematológicos e bioquímica clínica ocasionados em coelhos da raça Nova Zelândia inoculados com peçonha de *L. intermedia* em diferentes tratamentos.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

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

#### **4.1 Local**

O estudo foi realizado na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), na cidade de Lages/SC, nas dependências do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), e contou com a colaboração dos Serviços do Laboratório Clínico Veterinário.

#### **4.2 Animais**

Foram utilizados 30 coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, machos, adultos, com peso variando de 2,0 a 3,5kg, cedidos pela Universidade Federal de Santa Catarina, campus Curitibanos (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, ambiente com

temperatura controlada, entre 18°C e 22°C, com fornecimento de água e ração comercial *ad libitum*, conforme recomendações internacionais de bem-estar animal e da RN33 de 18 de novembro de 2016 do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 4.3 Peçonha

O Instituto Butantan forneceu a peçonha utilizada no presente estudo, na forma liofilizada (5mg), sendo diluída em PBS estéril antes da inoculação, obtida através de eletroestimulação da região esternal de exemplares de *L. intermedia*.

#### 4.4 Grupos

Os coelhos foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos de cinco animais (n=5): controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO<sub>3</sub>), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO<sub>3</sub>+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol).

#### 4.5 Amostras

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção da veia auricular marginal com o auxílio de cateter 24G, para obtenção de valores basais foram coletadas amostras de sangue antes da inoculação da peçonha (M0), também foram coletadas amostras de sangue 54 horas (M1) e 126 horas (M2) após a inoculação da peçonha, para análise hematológica, bioquímica e testes de hemostasia, realizadas posteriormente no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do CAV-UDESC. O sangue foi distribuído em microtubos com capacidade para 0,5 mL (Labor Import, Guangzhou Improve Medical, China) contendo etilenodiaminotetracético (EDTA), ou citrato de sódio 3,2%, ou ativador de coágulo, o primeiro contendo EDTA para o hemograma, o segundo para obtenção de plasma contendo citrato de sódio 3,2% para testes de hemostasia e o terceiro para obtenção de soro para análise bioquímica por meio de kits comerciais específicos. Para obtenção de soro e plasma as amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 10 minutos.

A urina foi obtida após eutanásia dos animais, que ocorreu no momento 2 (M2) 126 horas após a inoculação da peçonha, por compressão vesical, coletadas em coletor universal

estéril para imediato processamento e congelamento do sobrenadante, para posterior análises bioquímicas e obtenção da Relação proteína:creatinina urinária (RPCU). Para obtenção do sobrenadante da urina as amostras foram centrifugadas a 1.000 g por 5 minutos.

## 4.6 Exames laboratoriais

### 4.6.1 Hemograma

Inicialmente foram confeccionadas extensões sanguíneas em lâminas de vidro fixadas com metanol e coradas com corante rápido hematológico (NewProv, Pinhais-PR). Por meio da leitura dessas lâminas por microscopia óptica de luz (1000X, em óleo de imersão) foi realizada a contagem diferencial de leucócitos, avaliação da morfologia, tamanho, cor e alterações dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, e contagem estimada de plaquetas. A determinação do hematócrito, a avaliação do plasma e a mensuração da Proteína plasmática total (PPT) foi mensurado pelo método de microhematócrito (JAIN, 1993). Foi verificada a coloração e aparência do plasma para verificar a presença de hemólise, lipemia ou icterícia. Com o uso de um analisador hematológico automático (SDH-3 Vet, Labtest) foram mensurados a distribuição do diâmetro eritrocitário (RDW). Os valores do volume globular médio (VGM) e da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram calculados.

Para avaliação plaquetária foi utilizada a contagem total fornecida pelo analisador hematológico automático (SDH-3 Vet, Labtest) e confirmação deste pela estimativa de contagem plaquetária em esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico rápido (JAIN, 1993).

### 4.6.2 Hemostasia

Para avaliar se algum dos tratamentos promoveu alterações no sistema de coagulação, realizou-se os testes: Tempo de protrombina (TP) e Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000g em centrífuga (FANEM, Guarulhos – SP) para a obtenção de plasma, que foram armazenados a -20°C até o processamento. Os testes foram realizados manualmente, com auxílio de kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante (CLOT, Sorocaba – SP).

#### **4.6.3 Bioquímica**

Para a realização das dosagens dos parâmetros bioquímicos, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000g em centrífuga (FANEM, Guarulhos – SP) para a obtenção de soro, que foram armazenados a -20°C até o processamento. As análises bioquímicas mensuradas foram: aspartato aminotransferase (AST) (método UV), alanino aminotransferase (ALT) (método UV), fosfatase alcalina (FA) (método Bowers e Mc Comb modificado), ureia (método enzimático UV), creatinina (método Picrato alcalino Jaffé), gama-glutamil transferase (GGT) (método Szasz modificado), creatina Quinase (CK) (método UV), colesterol (método Enzimático-Trinde) triglicérides (método Enzimático-Trinde), glicose (método GOD-Trinder), proteínas totais (método Biureto), albumina (método Verde de bromocresol) e globulina. Em analisador automático Labmax Plenno, utilizando kits comerciais (Labtest® - Lagoa Santa/MG, Brasil) e soro controle universal (Qualitrol 1H®, Labtest), conforme orientação do fabricante. O valor de Globulina foi obtido através da subtração do valor de albumina do valor de proteínas totais.

#### **4.6.4 Urinálise**

A urinálise é realizada à semelhança da análise da urina dos outros mamíferos (JENKINS, 2008). A amostra da urina foi obtida de forma espontânea e/ou por compressão vesical, logo após eutanásia dos animais. As amostras foram processadas em até uma hora após a colheita iniciando com o exame físico da urina, seguido pelo exame químico realizado com fitas de urinálise veterinária (Uriquest plus vet - Labtest). A densidade urinária foi mensurada por refratometria (Digit- Biosystems, Brasil). Em seguida separadas preferencialmente 5 ml de urina em tubo Falcon e centrifugadas a 1000 g por 5 minutos.

Com o sobrenadante foi realizado a Relação proteína:creatinina urinária (RPCU), calculando a razão entre o valor de proteína e o de creatinina, ambas expressas na mesma unidade (mg/dL). A dosagem de Proteína e Creatinina foi realizado em aparelho bioquímico automático (Labmax Plenno, Labtest) com utilização de kit comercial (Labtest, Brasil). Para dosagem de proteína na urina utilizou-se kit comercial, que se fundamenta no princípio do vermelho de pirogalol, em urina total. Para a dosagem de creatinina urinária utilizou-se o kit comercial em reação de ponto final com o princípio de Jaffé picrato alcalino. As amostras de urina foram diluídas em água purificada por osmose reversa, de modo a atingir a linearidade do

teste e o valor final foi devidamente corrigido. Após desprezar o sobrenadante, restando 0,5 mL no final do tubo de fundo cônico, foi realizado a sedimentoscopia por microscopia em aumento de 400x.

#### 4.7 Delineamento experimental

O período de cinco dias estabelecido como a duração do projeto, foi determinado com base em pesquisas que evidenciaram efeitos de necrose e seu impacto no tratamento, indicando que este intervalo de tempo é adequado para a realização deste estudo (TAVARES et al, 2004; TAVARES et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019). Os momentos selecionados no presente estudo, foram calculados considerando a procura tardia para o início do tratamento em humanos, de aproximadamente 6 horas, conforme relatada na literatura (ISBISTER; FAN, 2011; FINGERMANN et al., 2020). Além disso, levamos em conta as primeiras manifestações de lesão (edema e necrose), que geralmente ocorre em 48 horas após a picada da aranha-marrom, dessa forma o primeiro momento após a aplicação, foi feito 54 horas (M1) e o último momento 126 horas (M2) (RIBEIRO et al., 2019; OLIVEIRA-MENDES et al., 2020).

A dose de peçonha utilizada, foi baseada em trabalhos com metodologia semelhante à usada no presente estudo (TAVARES et al, 2004; TAVARES et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019). Injetou-se 2,5 $\mu$ g/kg de peçonha de *L. intermedia* diluído em solução salina tamponada com fosfato pH 7,0 (PBS), após tricotomia e antisepsia com clorexidina 0,5%, por via intradérmica, no dorso (região interescapular) dos coelhos dos grupos CP, TO3, TO3+pt, Tpt e Tol, utilizando agulha hipodérmica 30G, no grupo CN foi inoculada solução salina tamponada com fosfato pH 7,0 (PBS), via intradérmica, na mesma região. Foi utilizado acepromazina (1mg/kg, via subcutânea) em todos os animais.

Seis horas após a inoculação, foi realizado o tratamento dos grupos TO3, TO3+pt, Tpt e Tol durante cinco dias. Os tratamentos com O<sub>3</sub> subcutâneo e óleo ozonizado (TO3 e Tol) foram realizados a cada 24h, o grupo com tratamento de O<sub>3</sub> subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt) recebeu a aplicação de pomada a cada 12 horas e o ozônio a cada 24h, e o tratamento com a pomada de tetraciclina (Tpt) recebeu a aplicação de pomada a cada 12h.

Os animais do grupo CN foi aplicado apenas o veículo (PBS) nas quatro bordas da lesão, no tecido subcutâneo, a cada 24h. E o grupo CP foi aplicado apenas a peçonha de *L. intermedia* diluído em solução salina tamponada com fosfato pH 7,0 (PBS), a cada 24h.

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.

Houve monitoramento de todos os animais durante o dia e a noite pelos participantes do projeto avaliando sinais clínicos e lesões secundárias, a fim de detectar piora do quadro e se necessário realização de eutanásia.

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), as carcaças foram incineradas no setor de Patologia animal do CAV-UDESC.

#### 4.8 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 da ferida foram realizados com câmera convencional a uma distância de 1 metro do animal, e a avaliação clínica foi realizada verificando o formato, condições da pele perilesional e extensão da lesão (comprimento x largura) com paquímetro.

Para avaliação macroscópica levamos em conta as primeiras manifestações de lesão: edema, eritema e hemorragia, chegando à formação de halo isquêmico e tecido necrótico.

#### 4.9 Análise estatística

Os valores foram comparados entre grupos e momentos. Os dados referentes à avaliação estatística entre momentos dentro de cada grupo, realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos valores obtidos nas diferentes amostras. Esses dados foram submetidos ao teste de variância ANOVA, seguidas da comparação pelo Teste de Tukey. Para determinação das diferenças estatísticas entre grupos os resultados foram submetidos ao Teste t-Student. Os dados considerados fora da normalidade foram avaliados pelo Teste Kruskal-Wallis. A análise de correlação das variáveis, quando necessário, foi realizada por meio da determinação do coeficiente de correlação de Pearson. As diferenças foram consideradas

estatisticamente significativas quando valor de  $p < 0,05$ . Os dados foram tabulados e analisados pelo programa computacional Sigma Plot for Windows.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação clínica das lesões

A dose de 2,5 $\mu$ g/kg da peçonha de *L. intermedia* induziu lesão dermonecrótica típica nos animais, 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, corroborando com Ribeiro et al. (2019), que a partir de inoculações crescentes da peçonha de *L. intermedia* em coelhos, obteve a menor dose de peçonha capaz de induzir uma área necrótica de pelo menos 1 cm<sup>2</sup> em 72 horas, definindo a dose necrótica mínima de 2,4  $\mu$ g/kg da peçonha de *L. intermedia*, avaliando tratamento não convencional no loxoscelismo cutâneo. Em outro estudo, avaliou-se respostas hematológicas e hemostáticas com dose de 10  $\mu$ g/kg de peçonha de *Loxosceles gaucho* em coelhos (TAVARES et al., 2004).

Houve grande variabilidade no presente trabalho, em relação a apresentação clínica, não foi observada diferença entre os grupos quanto à área das lesões, sendo  $p=0,486$  (Figura 6). Neste estudo, o padrão das lesões diferiu entre os 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 havendo diferença estatística entre os grupos (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). As figuras foram selecionadas somente pela qualidade de imagem e não para diferenciar os tratamentos.

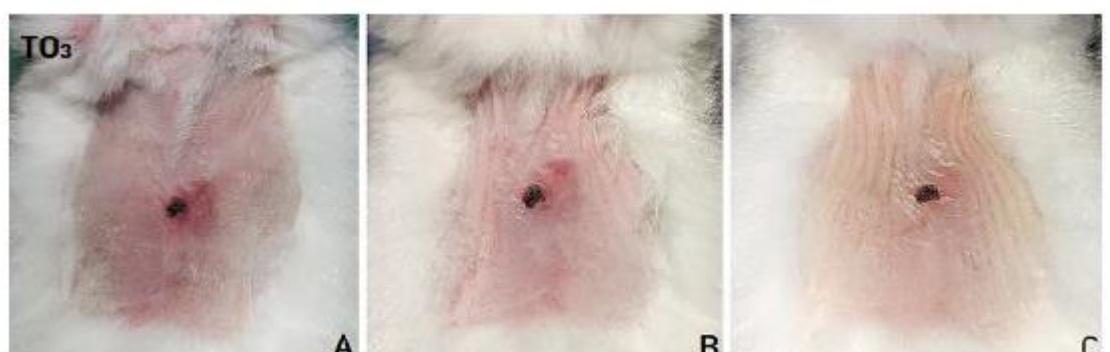
Figura 1. Evolução da ferida dermonecrótica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de  $2,5\mu\text{g}/\text{kg}$  da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo controle positivo (CP).



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: Elaborado pelos autores (2023).

Figura 2. Evolução da ferida dermonecrótica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de  $2,5\mu\text{g}/\text{kg}$  da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com  $\text{O}_3$  subcutâneo (TO<sub>3</sub>).



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.

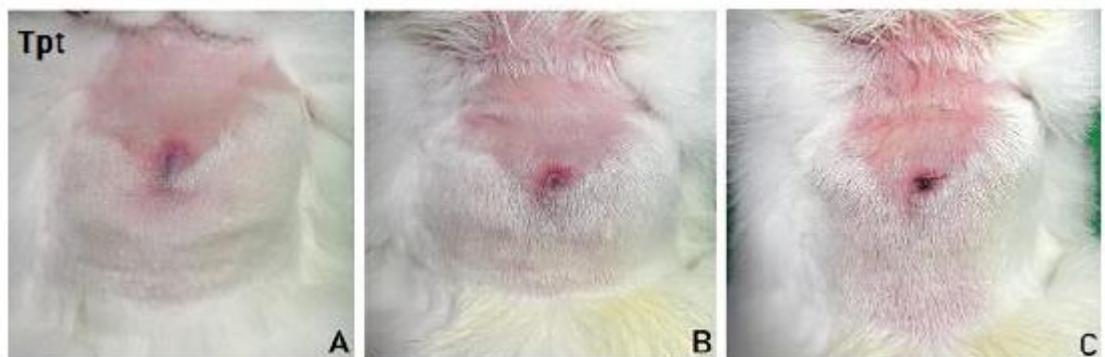
Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Figura 3. Evolução da ferida dermonecrótica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de  $2,5\mu\text{g}/\text{kg}$  da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com  $\text{O}_3$  subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt).



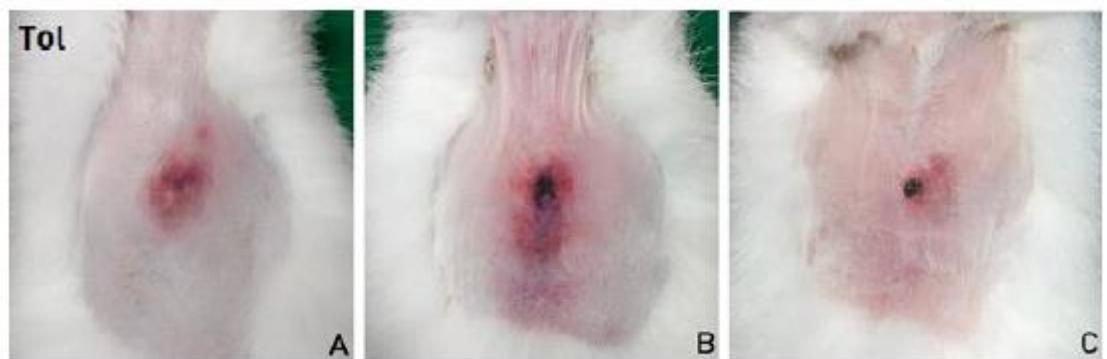
A) Ferida 6h após a inoculação da peçonha, com edema, eritema, hemorragia e halo isquêmico evidente; B) Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose e halo isquêmico evidente, 24h após a inoculação da peçonha; C) Ferida dermonecrótica no último dia do experimento, com área central de necrose cercada por halo isquêmico.  
Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Figura 4. Evolução da ferida dermonecrótica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de  $2,5\mu\text{g}/\text{kg}$  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: Elaborado pelos autores (2023).

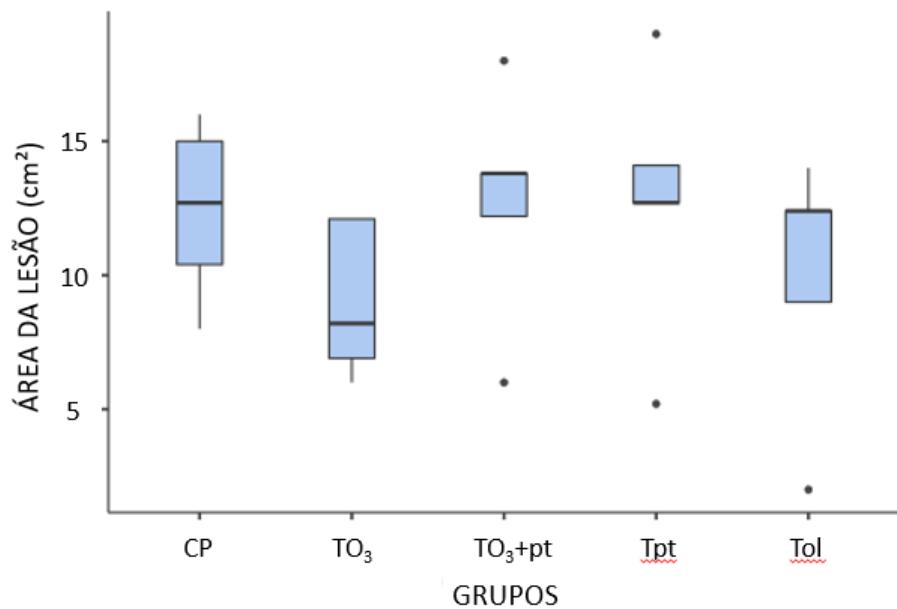
Figura 5. Evolução da ferida dermonecrótica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de  $2,5\mu\text{g}/\text{kg}$  da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com óleo ozonizado (Tol).



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: Elaborado pelos autores (2023).

Figura 6 - Avaliação da área da lesão em  $\text{cm}^2$  de coelhos, submetidos experimentalmente pela peçonha de *Loxosceles intermedia*, comparando os grupos controle positivo (CP), tratamento com  $\text{O}_3$  subcutâneo (TO<sub>3</sub>), tratamento com  $\text{O}_3$  subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO<sub>3</sub>+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol), com significância de  $p<0,05$ .



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Diferente do estudo de Ribeiro et al. (2019), onde demonstrou que o óleo de copaíba tem potencial no tratamento do loxoscelismo cutâneo contendo a progressão da dermonecrose, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, não foi encontrada diferença na redução do desenvolvimento das lesões dermonecróticas entre os animais tratados com ozonioterapia e pomada de tetraciclina, quando comparados aos animais do grupo controle positivo. Houve grande variabilidade em relação a apresentação clínica e ao tamanho das feridas nos animais do mesmo e de diferentes grupos (Figura 6). Mais estudos devem ser realizados para a avaliação de novas modalidades terapêuticas no loxoscelismo, tanto quanto à eficácia quanto à segurança.

## 5.2 Avaliação hematológica

Os valores de contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (VGM e CHGM), contagem de leucócitos totais, contagem diferencial de leucócitos não apresentaram diferença estatística entre grupos e momentos (Tabela 1).

Todos os animais do experimento apresentaram valores do hemograma dentro do padrão de normalidade para a espécie durante todo o estudo, considerando os valores de referência propostos por Campbell e Elis (2007).

Diferentemente do encontrado no estudo de Tavares et al. (2004) que, propuseram um estudo avaliando a respostas hematológicas e hemostáticas induzidas pela inoculação de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de veneno de *Loxosceles gaucho* em coelhos, obtiveram alterações no hemograma, a contagem média de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina diminuíram no grupo experimental em 120 horas, porém foram alterações não importantes a nível sistêmico, não foram observadas alterações para volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) no grupo experimental. Evidenciando a ausência de indício de hemólise intravascular, com base nos índices hematimétricos, nos coelhos inoculados.

Os valores plaquetários (Tabela 1) e leucocitários (Tabela 2) do presente estudo se encontram dentro do padrão de normalidade (THRALL et al., 2017). Diferentemente do estudo de Tavares et al. (2004) que verificou leucocitose por heterofilia com moderado desvio à esquerda, observada em 72 horas que se intensificou em 120 horas, de acordo com o processo inflamatório grave induzido pela lesão tecidual. Silva et al. (2004) evidenciou trombocitopenia e depressão medular de megacariócitos em grupos experimentais. Essas diferenças encontradas

nos estudos de Tavares et al. (2004) e Silva et al. (2004) se deve possivelmente ao volume de toxina introduzida nos grupos experimentais de  $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ , diferente da dose utilizada no presente estudo que foi de  $2,5\text{ }\mu\text{g/kg}$ .

Mesmo não havendo diferença estatística nas variáveis dos valores médios do número de plaquetas ( $p=0,078$ ), foi observado uma tendência de elevação nos grupos experimentais, nos momentos M2 e M3 (Tabela 1). Diferente de estudos mais antigos que trazem a agregação plaquetária e consequentemente trombocitopenia, como um evento sistêmico clássico desencadeado pela toxina loxocélica (FUTRELL, 1992; SILVA et al., 2004). O mecanismo molecular pelo qual o veneno induz a agregação plaquetária não é totalmente compreendido, mas isoformas de toxinas dermonecróticas (fosfolipase-D) são agentes que estimulam a agregação plaquetária (SILVA et al., 2004).

No entanto, no estudo de Tavares et al. (2004), apesar da diminuição da contagem de plaquetas nas primeiras 24 horas, normalizando em 72 horas, obtiveram posteriormente, aumento da contagem plaquetária em 120 horas. Lopes et al. (2020) realizaram um levantamento bibliográfico revisando 120 relatos de casos de loxoscelismo publicados em artigos de 2000 a 2020, verificou-se poucos casos de trombocitopenia, aproximadamente 4%, e 2% apresentaram coagulação intravascular disseminada (com base em estudos de coagulação), indicando que na literatura recente a trombocitopenia é descrita em casos isolados.

No presente estudo a tendência de elevação nos valores médios do número de plaquetas ( $p=0,078$ ), pode ser explicado devido ao seu papel na resposta inflamatória e na regulação imunológica. Isso ocorre devido a capacidade da plaqueta se ligar a patógenos, secretar citocinas e quimiocinas imunorreguladoras e expressar receptores para efeitos imunológicos e funções regulatórias (CHEN et al., 2020).

Durante a análise microscópica das lâminas de esfregaços sanguíneos dos coelhos estudados, não foi observado alterações na morfologia plaquetária. Um dos motivos se deve a dosagem da toxina ser a mínima capaz de induzir a necrose tecidual, não havendo, portanto, a ativação plaquetária necessária para ocorrer a secreção de moléculas inflamatórias que apoiam a migração e a adesão dos monócitos à lesão (RIBEIRO et al., 2019; CHEN et al., 2020).

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 plasmática total (PPT) nos momentos M0 antes, M1 (54h) e M2 (126h) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, com significância de  $p<0,05$

Variáveis	Momentos	Grupos						<i>p</i>
		CN	CP	TO <sub>3</sub>	TO <sub>3+pt</sub>	Tpt	Tol	
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	M0	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
	M1	5,67 ± 0,65	5,40 ± 0,72	5,38 ± 0,47	5,81 ± 0,33	5,64 ± 0,52	5,51 ± 0,75	
	M2	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 (%)	M0	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
	M1	36,2 ± 1,92	34,80 ± 1,30	34,8 ± 1,30	36 ± 1,52	34,8 ± 1,92	35 ± 1,87	
	M2	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)	M0	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
	M1	12 ± 0,93	11,3 ± 0,90	11,1 ± 0,43	11,9 ± 0,39	11,2 ± 0,32	11,3 ± 0,47	
	M2	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)	M0	64,3 ± 3,49	67 ± 5,56	64,3 ± 2,81	64,3 ± 2,49	64,4 ± 4,76	65 ± 5,52	0,989
	M1	64,4 ± 7,20	65,2 ± 7,49	65 ± 4,26	63 ± 1,64	65,2 ± 5,95	64,2 ± 6,59	
	M2	66,4 ± 6,95	64,4 ± 8,40	66,2 ± 4,07	63 ± 3,61	65 ± 9,43	66,2 ± 3,05	
CHGM (%)	M0	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
	M1	33,2 ± 1,78	32,4 ± 1,45	32 ± 0,89	32,6 ± 0,99	32,3 ± 1,30	32,3 ± 1,19	
	M2	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 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	M0	320 ± 61,1	343 ± 73,2	389 ± 82,9	417 ± 28,0	407 ± 110	317 ± 40,5	0,078
	M1	373 ± 44,7	497 ± 102	357 ± 164	427 ± 13,0	528 ± 144	405 ± 175	
	M2	385 ± 77,9	584 ± 98	576 ± 76,4	484 ± 167	545 ± 108	556 ± 153	
PPT (g/dL)	M0	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
	M1	5,86 ± 0,21	5,88 ± 0,41	5,88 ± 0,60	5,72 ± 0,47	5,92 ± 0,43	5,90 ± 0,31	
	M2	5,55 ± 0,38	5,98 ± 0,44	5,97 ± 0,40	6,02 ± 0,11	5,72 ± 0,42	6,22 ± 0,79	

Grupos: Controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO<sub>3</sub>), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO<sub>3+pt</sub>), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol). Momentos (M0, M1 e M2); *p*= nível de significância  $p<0,05$  entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão do número total de leucócitos, heterófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos nos momentos M0 antes, M1 (54h) e M2 (126h) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, com significância de  $p<0,05$

Variáveis	Momentos	Grupos						$p$
		CN	CP	TO <sub>3</sub>	TO <sub>3+pt</sub>	Tpt	Tol	
Leucócitos (/μL)	M0	$6.490 \pm 1.641$	$6.994 \pm 1.843$	$6.086 \pm 1.600$	$6.212 \pm 1.535$	$6.980 \pm 1.560$	$6.546 \pm 824$	0,736
	M1	$6.250 \pm 868$	$7.436 \pm 2.042$	$7.162 \pm 1.934$	$6.578 \pm 1.497$	$6.748 \pm 2.286$	$6.786 \pm 1.943$	
	M2	$6.305 \pm 1.446$	$6.534 \pm 1.546$	$6.808 \pm 2.844$	$6.622 \pm 1.909$	$6.003 \pm 1.247$	$6.928 \pm 1.143$	
Heterófilos (/μL)	M0	$2.085 \pm 461$	$3.109 \pm 1.602$	$2.434 \pm 555$	$1.936 \pm 436$	$2.701 \pm 1.194$	$1.899 \pm 634$	0,191
	M1	$2.053 \pm 670$	$3.156 \pm 1.645$	$3.194 \pm 990$	$2.472 \pm 799$	$2.760 \pm 1.426$	$2.959 \pm 1.036$	
	M2	$2.298 \pm 1.447$	$3.115 \pm 985$	$2.808 \pm 2.244$	$2.617 \pm 490$	$2.394 \pm 1.438$	$2.621 \pm 1.819$	
Linfócitos (/μL)	M0	$2.435 \pm 391$	$2.190 \pm 525$	$2.566 \pm 323$	$2.688 \pm 413$	$2.049 \pm 763$	$2.632 \pm 297$	0,422
	M1	$3.564 \pm 561$	$2.766 \pm 735$	$3.215 \pm 650$	$3.539 \pm 908$	$2.567 \pm 437$	$2.903 \pm 429$	
	M2	$3.962 \pm 580$	$3.680 \pm 297$	$3.575 \pm 768$	$3.587 \pm 844$	$3.440 \pm 920$	$3.711 \pm 1.043$	
Eosinófilos (/μL)	M0	$120 \pm 230$	$53,6 \pm 65,5$	$12,2 \pm 27,3$	$33,6 \pm 52,9$	$21,6 \pm 30,0$	$12,2 \pm 27,3$	0,615
	M1	$24,8 \pm 34$	$37,4 \pm 55,8$	$37,4 \pm 55,8$	$12,4 \pm 27,7$	$12,4 \pm 27,7$	$24,8 \pm 34,0$	
	M2	$46,4 \pm 104$	$0 \pm 0$	$15,4 \pm 34,4$	$30,8 \pm 42,2$	$15,4 \pm 34,4$	$0 \pm 0$	
Monócitos (/μL)	M0	$385 \pm 198$	$194 \pm 134$	$269 \pm 119$	$215 \pm 84,8$	$141 \pm 59,5$	$153 \pm 93,8$	0,794
	M1	$249 \pm 192$	$237 \pm 92,3$	$175 \pm 81,3$	$224 \pm 94,4$	$224 \pm 195$	$187 \pm 88$	
	M2	$170 \pm 149$	$170 \pm 115$	$186 \pm 141$	$309 \pm 219$	$278 \pm 209$	$340 \pm 223$	

Grupos: Controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO<sub>3</sub>), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO<sub>3+pt</sub>), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol). Momentos (M0, M1 e M2);  $p$ = nível de significância  $p<0,05$  entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

### 5.3 Avaliação bioquímica

Os valores de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, gama glutamiltransferase (GGT), creatinaquinase (CK), colesterol, triglicérides, glicose, proteínas totais, albumina e globulina não apresentaram diferenças estatísticas entre grupos e momentos (Tabela 3).

Observou-se valores superiores de CK considerando os valores de referência propostos por Thrall et al. (2017), esse resultado possui significado clínico que aponta para uma possível lesão do tecido muscular. Porém no presente trabalho, verificou-se valores superiores de CK em todos os grupos inclusive no grupo controle negativo, esse aumento possivelmente foi ocasionado por esforço físico devido ao estresse que ocorre durante manipulação nesses animais (MELILLO, 2007).

Em problemas musculares, é conveniente dosar também a AST. Ocorre elevação da CK antes da AST na dinâmica destas enzimas, assim, esse padrão de alteração pode indicar o estágio agudo do transtorno, com a CK aumentada e baixa AST. A AST é encontrada em diferentes tipos celulares incluindo hepatócitos, eritrócitos e miócitos cardíacos e musculares. Entretanto é mais útil nas avaliações hepatocelular e muscular por causa da sua alta atividade nas células desses tecidos. Como não foi observado aumento de ALT e AST nos coelhos após administração do veneno, pode-se inferir que ele não foi capaz de causar lesão hepática e muscular crônica (THRALL et al., 2017).

Tavares et al. (2004), em estudo semelhante ao proposto no presente trabalho, verificou aumento nos níveis de ALT e AST em 24 horas após inoculação de veneno loxocélico no grupo experimental, e se mantiveram normais nos demais momentos até 120 horas, porém foi considerada baixa pelo autor, não evidenciando problemas hepáticos ou musculares (no caso da AST), neste trabalho o autor não utilizou marcadores específicos para lesão musculares.

Observou-se hiperglicemia considerando os valores de referência propostos por Thrall et al. (2017), nas dosagens de todos os grupos e momentos. Isto pode ser explicado porque os animais foram alimentados com ração balanceada *ad libitum*. Outro fato importante é que coelhos são animais que se estressam facilmente e podem apresentar liberação de catecolaminas endógenas que podem ter efeito hiperglicemiante sistêmico (MELILLO, 2007).

Tabela 3 - Média (desvios-padrão) ou Mediana (Percentil 25; Percentil 75) da atividade enzimática da aspartatoaminotransferase (AST), aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) gama glutamiltransferase (GGT), creatinaquinase (CK), e da concentração de ureia, creatinina, colesterol, triglicérides, glicose, proteína total sérica (Proteína total), albumina e globulinas, após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos e momentos, com significância de  $p < 0,05$ .

Analito		Grupos						$p$
		CN	CP	TO3	TO3 e PT	TPT	TOL	
AST (UI/L)	Média	16,3	15,9	19,1	24,8	17,35	18,4	0,477
	dp	7,8	6,5	8,5	30,2	6,7	6,8	
ALT (UI/L)	Média	24,4	25,1	29,8	35,9	29,9	30,2	0,950
	dp	9,6	87	17,5	20,1	12,7	11,3	
FA (UI/L)	Média	147,2	119,3	124,9	119,3	129,9	124,7	0,983
	dp	50,1	47,3	45,9	32,8	58,1	38,7	
GGT (UI/L)	Média	4,66	4,31	6,26	3,8	4,81	3,86	0,713
	dp	0,7	0,48	0,75	0,72	1,95	0,92	
CK (UI/L)	Mediana	1623	1108	1831	1674	2206	2035	0,589
	25%	1029	890,4	907,4	1076	1242	1629	
	75%	1688	1532	2310	1743	2206	2035	
Ureia (mg/dL)	Média	23,6	25,13	23,97	25,13	27,18	24,27	0,439
	dp	4,53	0,5508	1,401	1,106	1,804	1,206	
Creatinina (mg/dL)	Média	0,64	0,68	0,70	0,69	0,62	0,69	0,560
	dp	0,06	0,08	0,06	0,05	0,05	0,06	
Proteína total (g/dL)	Média	6,38	5,82	6,35	6,55	6,4	6,66	0,677
	dp	0,13	0,13	0,25	0,18	0,43	0,19	
Albumina (g/dL)	Média	3,81	3,73	3,57	3,92	3,80	3,65	0,560
	dp	0,22	0,21	0,32	0,60	0,57	0,64	
Globulinas (g/dL)	Média	2,52	2,52	2,58	2,54	2,67	2,86	0,398
	dp	0,06	0,21	0,12	0,33	0,03	0,34	
Colesterol (mg/dL)	Média	67,13	54,37	86,6	71,87	83,25	73,93	0,859
	dp	7,76	7,5	2,69	8,81	21,36	15,92	
Triglicérides (mg/dL)	Mediana	125,2	141,5	181	200,8	123,2	191,4	0,421
	25%	122,8	140,4	148,4	195	116,6	151	
	75%	170	148,6	200,4	209,8	147,5	249,6	
Glicose (mg/dL)	Mediana	261,4	293,3	322,6	303	234,8	308	0,859
	25%	248	241,4	250,8	275,8	210	220,2	
	75%	289,8	299,4	341	323,2	245,8	312,8	

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).  $p$  = valor de  $p$  com nível de significância  $p < 0,05$  entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

## 5.4 Urinálise

A avaliação da urina consiste em três etapas, o exame físico, químico e análise do sedimento. No exame físico das amostras avaliadas obtivemos volume superior a 5 ml na maior parte das amostras; a coloração variou apenas de amarelo claro a amarelo escuro; o aspecto variou de discretamente turvo a intensamente turvo; a densidade variou de 1.011 a 1,035 (tabela 4). A densidade urinária, que deve ser medida com um refratômetro, indica a capacidade do rim de concentrar a urina, sendo que no coelho os valores podem variar de 1.003 a 1.036. (MELILLO, 2007).

No exame químico os valores de proteína, glicose, acetona e sangue oculto não houve alterações dignas de nota. O pH permaneceu alcalino ( $>7$ ) na maioria dos indivíduos.

Durante a sedimentoscopia não foram observadas outras alterações que fugissem da normalidade para espécie a não ser cristalúria, presente em todos os indivíduos sendo eles carbonatos de cálcio e/ou fosfato triplo (fosfato de amônio e magnésio), fato que pode ser considerado comum da urina de coelhos, pois eles absorvem uma grande quantidade de cálcio da dieta, sendo seu excesso, excretado pelos rins. Dessa forma, os níveis séricos desse mineral estão diretamente relacionados com a dieta do animal (REDROBE et al., 2002).

Os animais alimentados com uma dieta rica neste elemento excretam uma maior quantidade de cálcio por volume de urina, o que pode resultar na formação de ‘lodo vesical’, uma suspensão pastosa de pequenos cristais (REDROBE et al., 2002).

Os dados de urinálise obtidos com o presente estudo estão dentro do padrão de normalidade para a espécie, considerando os valores de referência propostos por Melillo (2007). Podemos destacar a densidade urinária, a Proteína urinária, Creatinina urinária e a Relação proteína:creatinina urinária (RPCU) (Figura 7), pela escassez dessas informações na literatura, além do fato, que em acidentes com aranhas do gênero *Loxoceles sp*, grande parte dos casos graves, seguidos de morte, são causados pela insuficiência renal aguda em pacientes, desenvolvida a partir da liberação da mioglobina durante a rabdomiólise no loxoscelismo, devido a uma intensa lesão local que atinge os músculos adjacentes (FRANÇA et al., 2002).

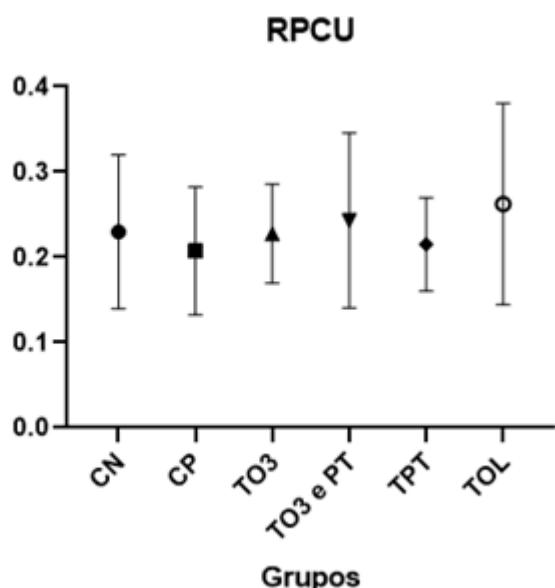
Tabela 4 - Média (desvios-padrão) ou Mediana (Percentil 25; Percentil 75) dos parâmetros da Densidade, Proteína Urinária, Creatinina Urinária e Relação proteína creatinina urinária (RPCU) da urinálise, submetidos experimentalmente pela peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos com significância de  $p<0,05$ .

		Grupos						
		CN	CP	TO3	TO3 e PT	TPT	TOL	<i>p</i>
Densidade	Mediana	1024	1023	1023	1016	1022	1020	0,684
	25% Percentil	1019	1021	1019	1011	1013	1013	
	75% Percentil	1037	1025	1027	1029	1033	1024	
Proteína Urinária	Média	23	14,75	22,25	20	23,75	16,25	0,6857
	DP	17,45	4,425	8,461	14,8	15,39	6,131	
Creatinina Urinária	Média	99,24	78,68	100,2	89,61	108,4	65,79	0,5674
	DP	51,91	30,91	34,67	55,24	57,93	19,08	
RPCU	Média	0,23	0,2075	0,2275	0,2433	0,215	0,2625	0,7002
	DP	0,09018	0,075	0,05795	0,1026	0,05447	0,1181	

Grupos: controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), tratamento com O<sub>3</sub> 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  $p<0,05$ .

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Figura 7 - Avaliação da Relação proteína creatinina urinária (RPCU), submetidos experimentalmente pela peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol), com significância de  $p<0,05$ .



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

## 5.5 Avaliação dos testes de coagulação

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os momentos e grupos estudados, evidenciando que não houve alteração sistêmica importante na hemostasia dos indivíduos estudados durante o período avaliado (Tabela 5).

O tempo médio de TP variou de 8,25 segundos (TOL) a 12,8 segundos (TPT). Em relação aos valores encontrados na literatura (10 a 14,8 segundos) (MENTRÉ et al. 2014), todos os grupos apresentaram valores médios dentro do padrão de normalidade para a espécie durante todo o estudo.

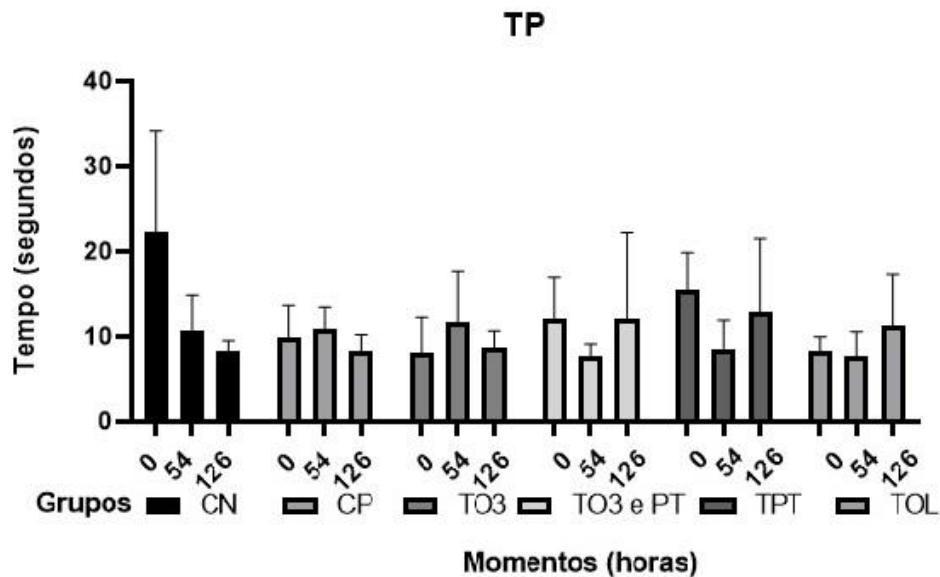
Tabela 5 - Tempo de protrombina (TP) e Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), em segundos, após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, com significância de  $p<0,05$ .

		Grupos						
		CN	CP	TO3	TO3 e PT	TPT	TOL	<i>p</i>
<b>TP</b>	Mediana	10,76	9,86	8,65	12	12,8	8,25	
	25% Percentil	8,275	8,325	8,02	7,6	8,58	7,6	0,502
	75% Percentil	22,34	10,8	11,65	12,14	15,54	11,25	
<b>TTPA</b>	Mediana	26,5	25,23	27,5	21,6	33,6	31,75	
	25% Percentil	24,1	24,75	26,2	18,8	27,6	22,8	0,591
	75% Percentil	41,4	40,8	36,25	30,2	33,8	35,5	

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).  $p$ = valor de  $p$  com nível de significância  $p<0,05$  entre os grupos experimentais.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

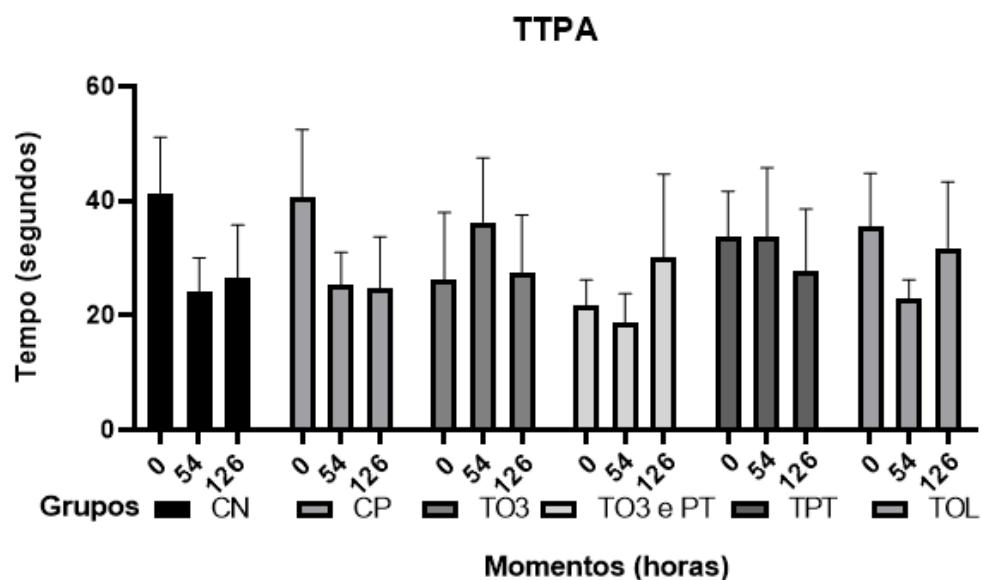
Figura 8 – Avaliação dos parâmetros: Tempo de protrombina (TP), em segundos, após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, Grupos: controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), tratamento com O<sub>3</sub> 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.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

O tempo médio de TTPA variou de 21,6 (TO3 E PT) a 33,6 (TPT) segundos apresentando dentro do padrão de normalidade para a espécie durante todo o estudo, quando relacionados com valores encontrados na literatura de 18 a 27 segundos – (TAVARES et al., 2015) e 106 a 113 segundos (MENTRÉ et al. 2014). Estudos avaliando testes de coagulação podem apresentar diferenças entre os resultados obtidos, o que pode ser ocasionado pelas diferentes metodologias utilizadas. Demonstrando a importância de se manter metodologias e valores de referência local.

Figura 9 – Avaliação do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), em segundos, após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos. Grupos: controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O<sub>3</sub> subcutâneo (TO3), tratamento com O<sub>3</sub> 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.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

## 6. CONCLUSÃO

Macroscopicamente o ozônio subcutâneo, o óleo de girassol ozonizado e a pomada de tetraciclina 5% não influenciaram de maneira significativa o processo inflamatório e de cicatrização nas lesões dermonecróticas induzidas pela peçonha de *L. intermedia* em coelhos.

Não houve alteração sistêmica em coelhos experimentalmente inoculados com a dose de 2,5  $\mu$ g/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia*, apesar do aparecimento de lesões dermonecróticas, comprovado por ausência de alterações em avaliação hemostática, hematológica, bioquímica clínica e urinálise, assim como da ozonioterapia administrada nas condições do presente estudo.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ALMAZ, M. E.; SÖNMEZ, I. S. Ozone therapy in the management and prevention of caries. **Journal Of The Formosan Medical Association**, v. 114, n. 1, p. 3-11, jan. 2015.
- ANZOLIN, A. P.; BERTOL, C. D. Ozone therapy as an integrating therapeutic in osteoartrosis treatment: a systematic review. **Brazilian Journal of Pain**, v. 1, n. 2, p. 171–175, 2018.
- 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.
- BOCCI, V.; ZANARDIA, I.; VALACCHI, G.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V. Validity of Oxygen-Ozone Therapy as Integrated Medication Form in Chronic Inflammatory Diseases. **Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets**, v. 15, n. 2, p. 127-138, 9 dez. 2015.
- BOMMER N. X., SHAW D. L., MILNE E. M., RIDYARD A.E. Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. **J Small An Practice**, v. 49, n. 1, p. 518-524, 2008.
- BORGES, G. Á.; ELIAS, S. T.; SILVA, S. M.; MAGALHÃES, P. O.; MACEDO, S. B.; RIBEIRO, A. P. D.; GUERRA, E. S. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **Journal Of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 3, p. 364-370, mar. 2017.
- BOUDREAUX, M. K. Platelet structure. In: SCHALM, O. W, **Veterinary Hematology**. 6. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 1232p; 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Panorama dos acidentes causados por aranhas no Brasil, de 2017 a 2021. **Boletim epidemiológico**, Brasília, v. 53n. 31, Ago. 2022. Disponível em: <[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em: 05 fev. 2023.
- CAMPBELL, T.; ELLIS, C. **Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology**. 3. ed. Blackwell Publishing Professional, 2007.
- CASE, P. D.; BIRD, P. S.; KAHLER, W. A.; GEORGE, R.; WALSH, L. J. Treatment of Root Canal Biofilms of Enterococcus faecalis with Ozone Gas and Passive Ultrasound Activation. **Journal Of Endodontics**, v. 38, n. 4, p. 523-526, abr. 2012.
- CHEN, Y.; ZHONG, H.; ZHAO, Y.; LUO, X.; GAO, W. Role of platelet biomarkers in inflammatory response. **Biomarker Research**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2 ago. 2020.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M.E.; CORONA, M.; LOMBARDI, P.; AVALLONE, L.; PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, n. 169, p. 465–467, 2005.

DAY, M. J. MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. D. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. **Ames: Iowa University Press**, 2001.

DELASOTTA, L. A; OROZCO, F; ONG, A; SHEIKH, E. Surgical treatment of a brown recluse spider bite: a case study and literature review. **J Foot Ankle Surg.** V. 3, n. 53, p.320. 2014.

ELVIS A. M, EKTA, J. S. Ozone therapy: a clinical review. **Journal Of Natural Science, Biology And Medicine**, v. 2, n. 1, p. 66, 2011.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **TRATADO DE MEDICINA INTERNA VETERINÁRIA**. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.179, p. 19151926. cap. 180, p. 1927-1940.

FINGERMANN, M.; ROODT, A. R.; CASCONE, O.; MIRANDA, M. V. Biotechnological potential of Phospholipase D for *Loxosceles* antivenom development. **Toxicon**: X, v. 6, p. 100036, jun. 2020

FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; ABDULKADER, R. Rhabdomyolysis in presumed viscero-cutaneous loxoscelism: report of two cases. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 287-290, maio 2002.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal Of The Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261-267, out. 1992.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, p.41-45, 2005.

GARRAUD, O.; HAMZEH-COGNASSE, H.; POZZETTO, B.; CAVAILLON, J-M.; COGNASSE, F. Bench-to-bedside review: platelets and active immune functions - new clues for immunopathology? **Critical Care**, v. 17, n. 4, p. 236, 2013

GERSHWIN, L. J. Comparative Immunology of Allergic Responses. **Annual Review Of Animal Biosciences**, v. 3, n. 1, p. 327-346, 16 fev. 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11a ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2006. cap. 36, p. 457-468.

HÄNNINEN, K. Contribution of Excited Ozone and Oxygen Molecules to the Formation of the Stratospheric Ozone Layer. **Environment And Ecology Research**, v. 7, n. 3, p. 121-134, maio 2019.

HARRIS, D. J. Clinical tests In: TULLY, T. N.; DORRESTEIR, G. M.; JONES, A. K. **Handbook of avian medicine**. 2 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p.79-82.

HOFFBRAND A. V., MOSS P. A. **Fundamentos em hematologia**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2013; 462p.

ISBISTER, G. K; FAN, H. W. Spider bite. **The Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039-2047, dez. 2011.

JAIN N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 417p. 1993.

JENEROWICZ, D.; SILNY, W.; DAŃCZAK-PAZDROWSKA, A.; POLAŃSKA, A.; OSMOLA-MAŃKOWSKA, A.; OLEK-HRAB, K. Environmental factors and allergic diseases. **Ann Agric Environ Med**. 2012

JENKINS, J.; R. Rabbit Diagnostic Testing. **Journal Of Exotic Pet Medicine**, v. 17, n. 1, p. 4-15, jan. 2008.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**.6.ed. San Diego: Academic Press, 2008.932p.

LEVIN, C; ROZEMMAN, D; SAKRAN, W; HALEVY, R; PELEG, S; KOREN, A. Severe Thrombocytopenia and Dermonecrosis after *Loxosceles* Spider Bite in a 3-Year-Old Child. **The Journal Of Pediatrics**, v. 163, n. 4, p. 1220-1230, out. 2013.

LICARI, L. G.; KOVACIC, J. P. State-of-the-Art-Reviews. Thrombin physiology and pathophysiology. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 11 – 22, 2009.

LOPES, P. H; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; MARQUES, M. O. T.; TAMBOURGI, D.; V. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. **Archives Of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1461-1477, 30 mar. 2020.

MACKMAN, N.; TILLEY, R. E.; KEY, N. S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 1687 – 1693, 2007.

MAGALHÃES, I. L.; BRESCOVIT, A.; SANTOS, A. Phylogeny of Sicariidae spiders (Araneae: Haplogynae), with a monograph on Neotropical Sicarius Zool. **J. Linn. Soc.**, v. 179, p. 767-864, 2017.

MALIQUE, C. M.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L. C.; CONDE, M. R.; NOVAES, C. T.G.; RISK, J. Y.; FRANÇA, F. O.; MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664-671, dez. 2011.

MELILLO, A. Rabbit Clinical Pathology. **Journal Of Exotic Pet Medicine**, v. 16, n. 3, p. 135-145, jul. 2007.

MENTRÉ, V.; BULLIOT, C.; LINSART, A.; RONOT, P. Reference intervals for coagulation times using two point-of-care analysers in healthy pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Record**, v. 174, n. 26, p. 658-658, jun. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021. Ministério da Saúde. Brasil. **Portal da Saúde**. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – sinan Net (2022) Disponível em: <[www.tabnet.datasus.gov.br](http://www.tabnet.datasus.gov.br)>. Acesso em: 05 ago. 2022.

NELSON, R. W; COUTO, C. G, **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Guanabara KOOGAN, p. 681-683. 2001.

OLIVEIRA, E. C.; FERNANDES, C. P.; SANCHEZ, E. F.; ROCHA, L.; FULY, A. L. Inhibitory Effect of Plant *Manilkara subsericea* against Biological Activities of *Lachesis muta* Snake Venom. **Biomed Research International**, v.14, p. 1-7, 2014.

OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; CHATZAKI, M.; SALES-MEDINA, D. F.; LEAL, H. G.; VEER, R. D.; BISCOTO, G. L.; GONÇALVES, P. M.; SILVA, T. S.; GUERRA-DUARTE, C.; KALAPOTHAKIS, E. From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: an overview focused on *Loxosceles similis*. **Toxicon**, v. 173, p. 5-19, jan. 2020.

ORLANDIN J. R.; MACHADO L.C.; AMBRÓSIO C. E.; TRAVAGLI V. Ozone and its derivatives in veterinary medicine: A careful appraisal. **Veterinary And Animal Science**, v. 13, p. 100-191, set. 2021.

PICCIONE, G. et al. Effect of storage conditions on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen concentration on canine plasma samples. **Journal Of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, p. 121, 2010.

REDROBE, S. Calcium metabolism in rabbits. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 11(2), 94–101, 2002.

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.

RICARDO, L. M.; DIAS, B. M.; MÜGGE, F. L.B.; LEITE, V. V.; BRANDÃO, M. G.L. Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: the case studies of *stryphnodendron adstringens* (mart.) coville (barbatimão) barks and *copaifera* spp. (copaíba) oleoresin in wound healing. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 319-336, jun. 2018.

RIDDEL, J. P. et al. CE: Theories of Blood Coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 24, n. 3, p. 123 – 131, 2007.

ROBINSON, J. R.; KENNEDY, V. E.; DOSS, Y.; BASTARACHE, L.; DENNY, J.; WARNER, J. L. Defining the complex phenotype of severe systemic loxoscelism using a large electronic health record cohort. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. 1-15, 19 abr. 2017.

SCIORSCI, R.L.; LILLO, E.; OCCHIOGROSSO, L.; RIZZO, A. Ozone therapy in veterinary medicine: a review. **Research In Veterinary Science**, v. 130, p. 240-246, jun. 2020.

SHARMA, D; BRUMMEL-ZIEDINS, K. E.; BOUCHARD, B. A.; HOLMES, C. E. Platelets in Tumor Progression: a host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 229, n. 8, p. 1005-1015, 23 abr. 2014.

SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B., APPEL, M. H.; MANGILI, O. C; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Aranhas marrons e loxoscelismo. **Toxicon**, v. 44, p. 693–709. 2004.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 220-225. 2011.

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.

TAVARES, F. L; CIRILLO, M. C; SILVA, S, SANTORO, M. L, BARBARO, K. C, REBECHI, I. M. M; SANO-MARTINS. 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, out. 2004.

TAVARES, F. L; PEICHOTO, M; MARCELINO, J; BARBARO, K. C; CIRILLO, M. C; SANTORO, M. I; SANO-MARTINS, I. Platelet participation in the pathogenesis of dermonecrosis induced by *Loxosceles gaucho* venom. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 666-676, 6 ago. 2015.

TAVARES, F. L; PEICHOTO, M; RANGEL, D. M; BARBARO, K. C; CIRILLO, M. C; SANTORO, M. L; SANO-MARTINS, I. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1567-1574, 19 jan. 2011.

THRALL, M.A. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkins, p.221-224. 2007.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; SILVIETTI, A.; BOCCI, V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 5, p. 504-511, dez. 2007.

TRAVE, I.; BARABINO, G.; PARODI, A. Cutaneous Loxoscelism. **Jama Dermatology**, v. 156, n. 2, p. 203, 1 fev. 2020.

TRIPLETT, D. A. Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1260-1269, 2000.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **RETINA**, v. 29, n. 1, p. 1 – 7, 2009.