












Avaliação de células mesenquimais e dapsona para o tratamento de feridas dermonecroticas causadas pelo veneno de *Loxosceles laeta* em coelhos

Evaluation of mesenchymal cells and dapsona for the treatment of dermonecrotic wounds caused by Loxosceles laeta venom in rabbits

Guilherme de Caro Martins¹ , Maira Souza Oliveira Barreto² , Ana Flávia Machado Botelho^{3*} , Conrado Gamba¹ , Clara Guerra Duarte¹ , Benito Soto-Blanco¹ , Adriane Pimenta Costa-Val Bicalho¹ , Geovanni Dantas Cassali¹ , Alfredo Miranda de Goes¹ , Carlos Delfin Chávez Olórtégui¹ , Marília Martins Melo¹ 

¹Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

²Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

³Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil

*Correspondente: anaflaviamabo@gmail.com

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia das células-tronco mesenquimais (CTMs), isoladas ou associadas à dapsona (DAP), no tratamento de feridas dermonecroticas causadas pelo veneno de *Loxosceles laeta*. Vinte e cinco coelhos machos foram distribuídos em cinco grupos. O controle negativo recebeu água ultrapura (C-), enquanto todos os outros grupos foram injetados com 20 µg de veneno de *L. laeta*. Após 4 horas, cada grupo recebeu um dos seguintes tratamentos: PBS (C+), DAP, CTMs e DAP + CTMs. Os animais foram avaliados diariamente durante 12 dias, e feitos registros fotográficos para análise da ferida e no 12º dia, foram eutanasiados e, retiradas amostras de pele para análise histológica. Observou-se que a DAP apresentou o melhor percentual de contração da ferida no terceiro dia. Nos tratamentos com CTMs, observou-se uma contração negativa da ferida tanto para as CTMs isoladas, bem como a associação CTMs + DAP em relação ao PBS, possivelmente, pelo aumento da inflamação inicial após a aplicação de células-tronco. Isso é devido ao fato de que as CTMs secretam um amplo espectro de moléculas bioativas como citocinas e fatores de crescimento que favorecem a regeneração. Histologicamente, observou-se que os animais de C+ apresentaram extensas áreas de necrose, úlceras, infiltrado neutrofílico, além de mineralização. Houve aumento de deposição de colágeno no tratamento CTMs + DAP, no entanto, a vascularização permaneceu inalterada. Este é o primeiro relato usando CTMs e CTMs + DAP como tratamento para loxoscelismo cutâneo e mais estudos são necessários para determinar seu uso como terapia alternativa para lesões demonecroticas causadas pela aranha *Loxosceles*.

Palavras-chave: loxoscelismo; células-tronco; CTMs; veneno de aranha; reparo de feridas.

Abstract

This study aimed to evaluate the efficacy of mesenchymal stem cells (MSC), alone or associated with dapsona (DAP), in treating dermonecrotic wounds caused by *Loxosceles laeta* venom. Twenty-five male rabbits were distributed into five groups. Negative control received ultrapure water (C-), whilst all other groups were injected with 20 µg of *L. laeta* venom. After 4 hours, each group received one of the following treatments: PBS (C+), DAP, MSC, and DAP+MSC. Animals were evaluated daily and photographic records made for analysis of wound area. Twelve days after, animals were euthanized and skin samples removed for histological analysis. We observed that DAP showed the best percentage of wound contraction at day 3. In the treatments using MSCs, a negative value of wound contraction was observed for the isolated MSCs, as well as a lower contraction value for the association of the MSC + DAP when compared to PBS, probably, by the increase in initial inflammation after the application of stem cells, due to the fact that MSCs secrete a broad spectrum of bioactive molecules such as cytokines and growth factors that favor regeneration. Histologically, it was observed that animals of C+ showed extensive areas of necrosis, ulcers, neutrophilic infiltrate, and mineralization. Collagen deposition showed increase in MSC+DAP treatment, however vascularization remained unchanged. This is the first report using MSC and MSC+DAP as a treatment for cutaneous loxoscelism and more studies are needed to determine its use as an alternative therapy for dermonecrotic lesions caused by *Loxosceles* spider.

Key words: loxoscelism; MSC; stem cells; spider venom; wound repair.

Recebido: 18 de abril de 2022. Aceito: 13 de julho de 2022. Publicado: 30 de agosto de 2022.



Introdução

O loxoscelismo é descrito em todos os continentes e corresponde à forma mais grave de araneísmo no Brasil^(1,2,3,4). A síndrome clínica pode se desenvolver em duas formas distintas: a forma cutânea, caracterizada por alterações locais, com ferida dermonecrotica de difícil cicatrização, e a forma cutâneo-visceral, apresentando importantes alterações sistêmicas como insuficiência renal aguda, distúrbios de coagulação e risco de óbito, além da lesão local^(5,6,7).

As alterações cutâneas e sistêmicas observadas nos acidentes loxoscelicos são decorrentes de múltiplos fatores, envolvendo danos teciduais diretos causados por componentes do veneno, lesão vascular secundária e liberação de enzimas por polimorfonucleares⁽⁷⁾. Apesar de ser uma mistura complexa de componentes, sabe-se que as fosfolipases D do veneno são as principais responsáveis pela dermonecrose. Essas enzimas são capazes de interagir com as membranas celulares, iniciando reações envolvendo o sistema complemento, plaquetas e leucócitos^(5,8).

O tratamento do envenenamento loxoscelico é baseado nos sinais clínicos observados e inclui o uso de dapsona, ácido acetilsalicílico, antibióticos de amplo espectro, corticosteroides, soro antiofidico específico, composto por anticorpos heterólogos desenvolvidos em equinos e novos tratamentos com anticorpos^(5,9,10,11,12,13). Apesar dessas opções de tratamento, a recuperação do tecido após extensa lesão dermonecrotica é lenta e a formação de cicatriz é difícil.

Uma possibilidade terapêutica para o reparo tecidual é o uso de células-tronco⁽¹⁴⁾. As células-tronco podem ser de origem embrionária, fetal ou de tecido maduro. Células-tronco mesenquimais (CTMs), de tecidos como medula óssea madura ou tecido adiposo, estão sendo amplamente utilizadas em ensaios experimentais de regeneração tecidual devido ao seu potencial de diferenciação em diversos tipos celulares e facilidade de isolamento e proliferação⁽¹⁵⁾. Têm potencial para se diferenciar em células cutâneas das camadas ectodérmica, mesodérmica e endodérmica da pele, com aplicações em medicina regenerativa^(16,17).

Até o momento, não existem estudos avaliando o uso de células-tronco no tratamento de feridas dermonecroticas causadas por loxoscelismo. Portanto, o objetivo principal deste trabalho é avaliar a eficácia de CTMs, isoladas ou associadas à dapsona, no tratamento de lesões dermonecroticas causadas pela inoculação experimental do veneno de *Loxosceles laeta* em coelhos. As feridas resultantes foram monitoradas pela avaliação da cicatrização tecidual, morfologia tecidual por exame histológico, quantificação de colágeno e imunohistoquímica.

Material e métodos

Isolamento de células-tronco mesenquimais (CTMs)

As CTMs foram obtidas do tecido adiposo extraído da região interescapular de dois coelhos doadores da raça Nova Zelândia, sob anestesia geral com propofol (6 mg/kg). O tecido coletado foi lavado em PBS e submetido à digestão enzimática com collagenase tipo II por 1 hora. Em seguida, a atividade da collagenase foi inibida pela adição de meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) fresco às células e centrifugação a 23°C, 1200 rpm por 10 minutos. O sedimento resultante foi suspenso em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e plaqueado em frascos de cultura estéreis T75. As culturas celulares foram mantidas em atmosfera úmida, a 37°C, 5% CO₂ até 90% de confluência. As células foram então destacadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,25%, diluídas na proporção de 1:3 e transferidas para outro frasco T75. O isolamento de CTMs foi baseado em sua capacidade de aderir aos frascos⁽¹⁸⁾.

Caracterização das CTMs

Entre a 3ª e a 5ª passagens, as CTMs foram caracterizadas fenotipicamente pela indução de diferenciação em células adipogênicas ou osteogênicas para confirmar sua pluripotência. Para diferenciação adipogênica, 5 x 10⁴ células/poço foram plaqueadas em placas de seis poços, com DMEM suplementado com 10% de FBS, dexametasona (0,5 µM), insulina (1 µM), indometacina (60 µM) e isobutilmetilxantina (0,5 µM)⁽¹⁵⁾. Os meios de cultura foram substituídos a cada três dias e a cultura foi mantida por 21 dias. Em seguida, as células foram coradas com Oil Red para evidenciar gotículas lipídicas no citoplasma, confirmando a diferenciação em adipócitos. Para diferenciação osteogênica, 5 x 10⁴ células/poço foram plaqueadas em placas de seis poços e cultivadas por 21 dias em DMEM suplementado com 10% de FBS, ácido ascórbico (50 µg/ml), β-glicerofosfato (10 mM) e dexametasona (0,1 µM). Os meios foram substituídos a cada três dias⁽¹⁵⁾.

Para avaliar a viabilidade celular das CTMs, foi realizado o ensaio de metabolização do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo tetrazolina). As células/m² (5 x 10⁴) foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas com 170 µl de MTT (5mg/ml; Sigma-Aldrich, EUA), a 5% CO₂, 37°C, por 2 horas. Os cristais de formazan formados foram observados em microscópio de luz invertida e então solubilizados pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) em HCl a 10%. A densidade óptica foi quantificada a 595 nm, em leitor de placas automatizado.

Atividade da fosfatase alcalina

Considerando que os osteoblastos diferenciados são capazes de secretar fosfatase alcalina ⁽¹⁹⁾, sua atividade foi medida em células plaqueadas para garantir a diferenciação, utilizando parâmetros semelhantes descritos na seção acima. A solução BCIP-NBT foi adicionada a cada poço e incubada por 2 horas. Os precipitados roxos foram solubilizados com SDS 10% HCl e a densidade óptica foi quantificada a 595 nm, em leitor de placas automatizado.

Animais

Vinte e cinco coelhos machos da raça Nova Zelândia, com um ano de idade, pesando 1,5 kg, foram utilizados ao longo deste estudo. Foram colocados em gaiolas metálicas individuais (75 cm x 30 cm), recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos seguindo princípios éticos, respeitando o bem-estar dos animais e minimizando eventuais desconfortos. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (Protocolo nº 83/2013).

Grupos experimentais e tratamentos

Após um período de adaptação de cinco dias, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de cinco animais. O grupo controle negativo (C-) foi inoculado apenas com água ultrapura. Todos os outros quatro grupos foram inoculados por via intradérmica com 20 µg de veneno de *L. laeta* diluído em 0,2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Todos os tratamentos iniciaram 4 horas após a injeção do veneno com a intenção de simular a identificação precoce da lesão e maximizar o efeito das terapias propostas, segundo Phillips et al. ⁽²⁰⁾. O grupo controle positivo (C+) foi tratado apenas com PBS (0,5 mL), injetado por via intradérmica em quatro pontos equidistantes do centro da lesão pré-formada. O grupo dapsona (DAP) recebeu uma dose de 2 mg/kg de dapsona diluída em etanol e água ultrapura (proporção 4:6) por cateter nasoesofágico a cada 24 horas por quatro dias. O grupo de células-tronco mesenquimais (CTMs) foi tratado com 1,25 x 10⁶ células suspensas em 0,5 mL de PBS, injetadas por via intradérmica em quatro pontos equidistantes do centro da lesão pré-formada, totalizando 5 x 10⁶ células injetadas por animal. O quinto grupo foi tratado com uma mistura de dapsona e células-tronco mesenquimais (DAP + CTMs), de acordo com os procedimentos descritos acima para cada tratamento.

Avaliação do tamanho da ferida

As feridas foram medidas e registradas

diariamente para verificar sua evolução de acordo com o protocolo de tratamento. Os registros fotográficos foram feitos com câmera digital (Canon Rebel XSI EOS zoom 24 mm), mantida a uma distância constante de 50 cm da ferida. Os dados coletados foram avaliados com o software IMAGE PRO. Para análise de contração da ferida, as medições foram feitas 3, 6, 9 e 12 dias após o tratamento. A porcentagem de contração da ferida foi calculada utilizando o modelo matemático proposto por Oliveira et al. ⁽²¹⁾ e Wu et al ⁽²²⁾:

$$\left(\frac{\text{área no dia 1} - \text{área no dia X}}{\text{área no dia 1}} \right) * 100$$

Avaliação histopatológica

Os animais foram eutanasiados doze dias após o tratamento por anestesia com propofol com dose superior a 10 mg/kg. Fragmentos de pele (5 cm x 6 cm) foram removidos e fixados em paraformol por 48 horas. Os tecidos fixados foram então processados, incluídos em parafina, e cortes histológicos de 4 µm de espessura foram retirados para posterior análise. Após coloração com hematoxilina-eosina (Merck®), imagens fixas do tecido cutâneo foram obtidas com microscópio Accu Scope, acoplado ao software TCS pro 500. Cada lâmina foi descrita às cegas por um patologista. Foram descritas alterações na epiderme, derme, estrutura morfológica muscular, intensidade e composição do infiltrado inflamatório e outros achados específicos, como mineralização tecidual.

Para confirmar a calcificação tecidual observada nas lâminas, foi realizada coloração de von Kossa (Merck®). A coloração tricrômica de Masson (Merck®) foi utilizada para avaliar o número total de fibras colágenas. O registro fotográfico (microscópio Accu Scope) foi utilizado com o software TCS pro 500 para a captura das imagens. As fibras de colágeno foram quantificadas usando o software ImageJ. A coloração Picro-sirus Red foi realizada para avaliar a diferenciação das fibras colágenas. Neste método, as fibras de colágeno tipo I são coradas de vermelho e as fibras de colágeno tipo III são esverdeadas. As fotos foram tiradas com o microscópio Leica Core acoplado ao software Leica Application Suite Core. Seis fotos de campos aleatórios da área da lesão de cada lâmina foram tiradas e as fibras coradas foram quantificadas usando o software ImageJ. A avaliação final foi feita considerando a média e o desvio padrão de cada grupo.

Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi usada para avaliar a angiogênese e o dano vascular dos tecidos da pele

afetados. O anticorpo monoclonal CD31 (clone JC70A, Dako) foi utilizado na diluição 1:20, com 16 horas de incubação, para marcar as células endoteliais. Para quantificar a área marcada pelo anticorpo utilizado, dez campos aleatórios da lesão de cada animal foram capturados utilizando o microscópio Accu Scope (400x) e o software de captura de imagem TCS pro 500. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ. A média de cada grupo foi calculada para avaliação estatística.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do software SAS v.9.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. O teste de Tukey foi empregado para a comparação das fibras colágenas totais, colágeno tipo III e área de angiogênese. A transformação logarítmica dos valores de colágeno tipo I foi realizada antes do teste de Tukey. A análise estatística da porcentagem de contração da ferida foi realizada usando uma abordagem de modelo linear misto do SAS, usando estrutura covariável de autocorrelação de primeira ordem. Os animais foram considerados como fator aleatório, com cada animal aninhado dentro dos tratamentos, com medidas repetidas ao longo do tempo. Dia significativo versus interações de tratamento foram examinados usando o procedimento PDIF com comparações pré-planejadas. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de tecidos adiposos

As CTMs utilizadas ao longo deste trabalho foram obtidas de tecido adiposo interescapular de coelhos doadores para evitar o manuseio estressante dos animais posteriormente envenenados e tratados, o que poderia afetar a cicatrização de feridas e a correta avaliação dos tratamentos empregados. As CTMs alogênicas são uma opção promissora devido à sua baixa imunogenicidade e capacidade imunossupressora e de reparo tecidual⁽²³⁾. Além disso, a extração de auto-CTM é demorada, dificultando seu uso imediato para tratar doenças agudas, como o envenenamento por aranhas. CTMs derivadas de tecido adiposo vêm ganhando importância e sendo cada vez mais utilizadas em experimentos, devido ao seu fácil isolamento, boa capacidade proliferativa e possibilidade de obtenção de excelente quantidade de células em um único procedimento. Isso possibilita o uso de menos animais doadores, quando comparado ao isolamento de CTMs da medula óssea⁽¹⁸⁾.

A caracterização das células-tronco derivadas do tecido adiposo confirmou sua identidade como células-tronco mesenquimais (CTMs) por estarem aderidas aos

frascos de cultura, apresentadas na forma fibroblástóide, e serem capazes de se diferenciar em tecido ósseo e adipogênico (Fig.1). A viabilidade celular foi ainda confirmada por testes de MTT e fosfatase alcalina (dados não demonstrados). As células foram então utilizadas para tratar feridas dermonecroticas induzidas por injeção intradérmica de veneno de *L. laeta*.

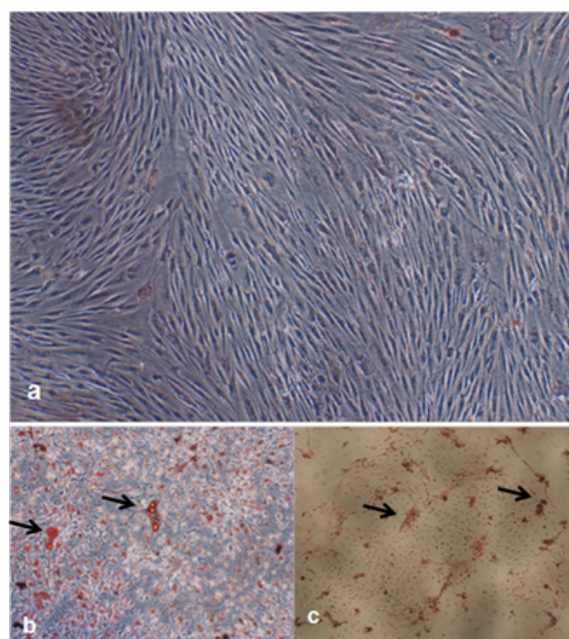


Figura 1. Fotomicrografias de células-tronco mesenquimais (CTMs) indiferenciadas e diferenciadas derivadas de tecido adiposo de coelho. **(a)** CTMs indiferenciadas cultivadas em meio não suplementado (400x). **(b)** CTMs cultivadas em meio específico para indução de diferenciação adipogênica, coradas com Oil Red (400x). As gotículas lipídicas estão marcadas em vermelho, demonstrando diferenciação bem-sucedida (setas). **(c)** CTMs cultivadas em meio específico para indução de diferenciação osteogênica, coradas com von Kossa (400x). A matriz mineralizada apresenta coloração acastanhada (setas).

Avaliação da ferida

Após a injeção do veneno, a avaliação macroscópica das feridas foi feita diariamente para permitir o acompanhamento da evolução da lesão e diferenciar os distintos grupos de tratamento. A quantidade de veneno injetado induziu uma lesão dermonecrotica típica^(11,24) que se iniciou com halo hemorrágico 4 horas após a injeção, associada a edema, eritema e sensibilidade exacerbada. Após 48 horas, a área hemorrágica transformou-se em área necrótica azulada. Quatro dias depois, formou-se uma crosta que posteriormente se despreendeu da pele (Fig.2a). Essa evolução típica confirmou o uso de coelhos como bons modelos animais para o loxoscelismo cutâneo^(5,25), ao contrário de camundongos e ratos, que não desenvolvem

dermonecrose. Deve-se ressaltar, no entanto, que o desenvolvimento de feridas em coelhos ocorre mais rapidamente do que em humanos ^(2,5,6). Isso pode ser

explicado por diferenças estruturais entre esses dois animais ou pelo fato de que feridas produzidas experimentalmente tendem a ser mais controladas.

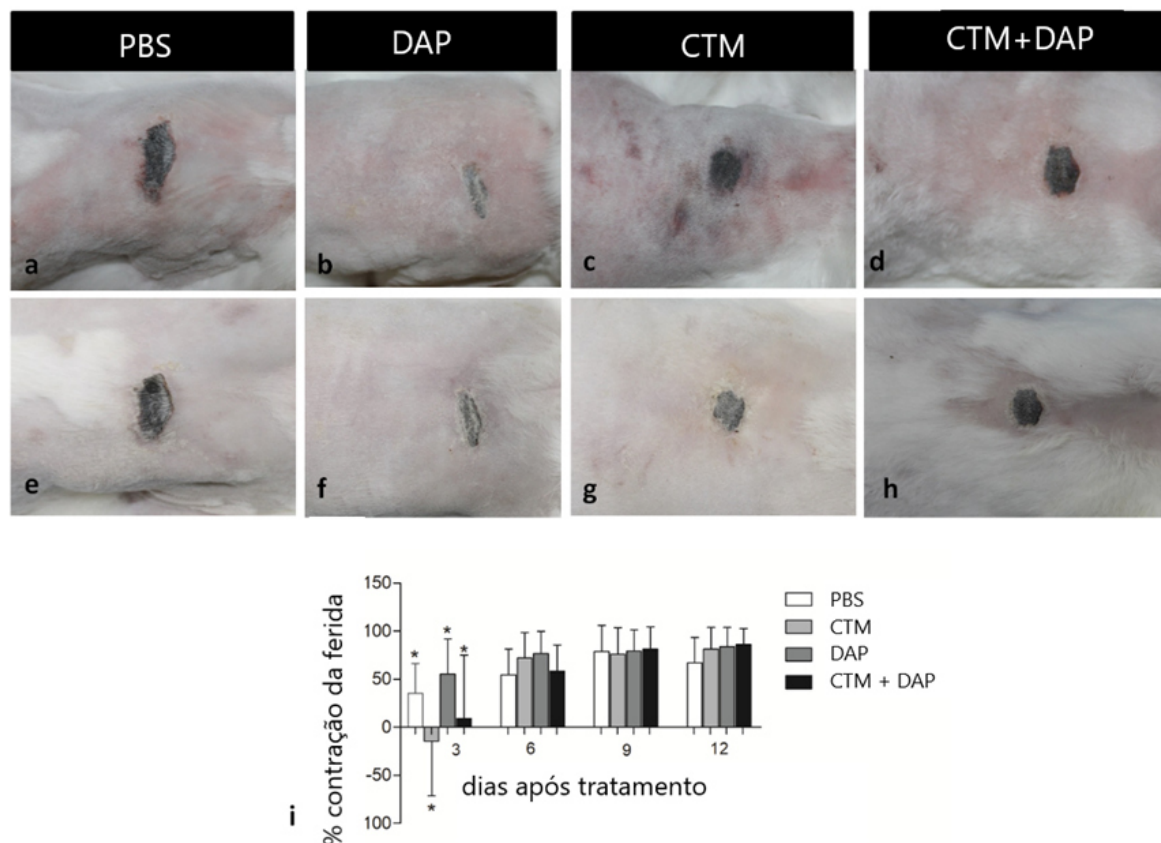


Figura 2. Evolução da dermonecrose de coelhos da Nova Zelândia após inoculação do veneno de *Loxosceles laeta* (20 µg) e tratados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), dapsona (DAP), células-tronco mesenquimais (CTMs) ou em associação de CTMs e DAP (CTM + DAP). **(a,b,c,d)**: Lesão dermonecrotica em coelhos quatro dias após o início do tratamento. **(e,f,g,h)**: Lesão dermonecrotica em coelhos 12 dias após o início do tratamento. **(i)** Valores médios de porcentagem de retração da ferida e desvio padrão usando uma abordagem de modelo linear misto do SAS, usando estrutura covariável de autocorrelação de primeira ordem. Os animais foram considerados como fator aleatório, com cada animal aninhado dentro dos tratamentos, com medidas repetidas ao longo do tempo. Dia significativo *versus* interações de tratamento foram examinados usando o procedimento PDIF com comparações pré-planejadas. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$. Após a inoculação do veneno de *L. laeta*, os grupos foram tratados com PBS (C+), células-tronco mesenquimais (CTMs), dapsona (DAP) ou em associação tanto com CTMs quanto com DAP (CTMs + DAP). As medições foram feitas 3, 6, 9 e 12 dias após o tratamento.

Avaliação morfométrica e taxa de contração da ferida

Por meio da avaliação dos valores médios de contração da ferida, detectou-se significância estatística no dia 3 em todos os tratamentos, sendo que a dapsona apresentou o melhor percentual de contração da ferida nesse momento. Nos tratamentos com CTMs, observou-se valor negativo de contração da ferida para as CTMs isoladas, bem como menor valor de contração para a associação CTMs + DAP quando comparado ao grupo PBS (Fig. 2i). Esse fato pode ser explicado pelo aumento

da inflamação inicial após a aplicação de células-tronco, que pode ocorrer nos primeiros dias, pois as CTMs secretam um amplo espectro de moléculas bioativas como citocinas e fatores de crescimento que favorecem um microambiente de regeneração ^(26,27). Não houve diferença estatística nos demais dias; entretanto, observou-se que os tratamentos que receberam CTMs e DAP foram superiores ao grupo PBS já no sexto dia ($P > 0,05$). Isso pode sugerir uma influência positiva na cicatrização de feridas, uma vez que fatores inflamatórios e células inflamatórias iniciam a regeneração tecidual por

reposição de células e componentes extracelulares. As CTMs podem contribuir para uma cicatrização de feridas mais rápida e eficaz, devido aos estímulos de reepitelização, proliferação de fibroblastos e neovascularização, como observado por Kim et al. (28). Esses estímulos ocorrem principalmente por efeito parácrino, através da produção de fatores solúveis como moléculas bioativas e fatores de crescimento que promovem um microambiente de reparo tecidual (26,27).

Ensaio clínico usando dapsona como tratamento para reparo de feridas mostram resultados contrastantes. Os benefícios da dapsona no tratamento da dermonecrose causada pelo loxoscelismo já foram relatados por Rees et al. (31), que utilizaram dapsona com ou sem excisão cirúrgica precoce de tecidos para tratar pacientes. Barret et al. (33) também utilizaram com sucesso a dapsona em modelo experimental com cobaias. Por outro lado, Phillips et al. (20) e Elston et al. (25) não observaram diferenças estatísticas na retração da ferida ao utilizar dapsona no tratamento de coelhos. A análise morfométrica para obtenção do percentual de retração da ferida durante o processo cicatricial tem se mostrado um método eficiente e acessível (21,22). A avaliação da taxa de retração da ferida em vez da área da ferida elimina as diferenças causadas por feridas de diferentes tamanhos iniciais que podem ser formadas, mesmo ao injetar exatamente a mesma quantidade de veneno.

Avaliação histopatológica

Ao se analisar as alterações histopatológicas de cortes de pele ferida na coloração HE, percebe-se que os animais do grupo PBS (C+) apresentaram áreas necróticas maiores, infiltrado neutrofílico intenso, hemorragia intradérmica e manchas de mineralização (Fig. 3b), confirmados pela coloração de von Kossa (Fig. 3d), como relatado por Elston et al. (25) e Ospedal et al. (29). Outros estudos também descrevem infiltração eosinofílica precoce (25,30) que não esteve presente em nosso estudo, provavelmente devido ao tempo decorrido desde o início do tratamento e coleta da amostra.

Os animais do grupo DAP apresentaram lesões menos significativas, com áreas de mineralização e angiogênese, assim como no grupo CTMs (Fig. 3c). As lesões no grupo CTMs + DAP foram consideravelmente mais discretas e o infiltrado inflamatório também foi menos intenso. Os animais do grupo controle negativo não apresentaram alterações (Fig. 3a). A infiltração neutrofílica tecidual é considerada uma das principais causas de lesões dermonecroticas observadas no loxoscelismo (4,5). Este fato foi confirmado no grupo PBS (C+), que apresentou intenso infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, além de formação de crostas e danos à epiderme e derme, superficial e profunda (Fig. 3b).

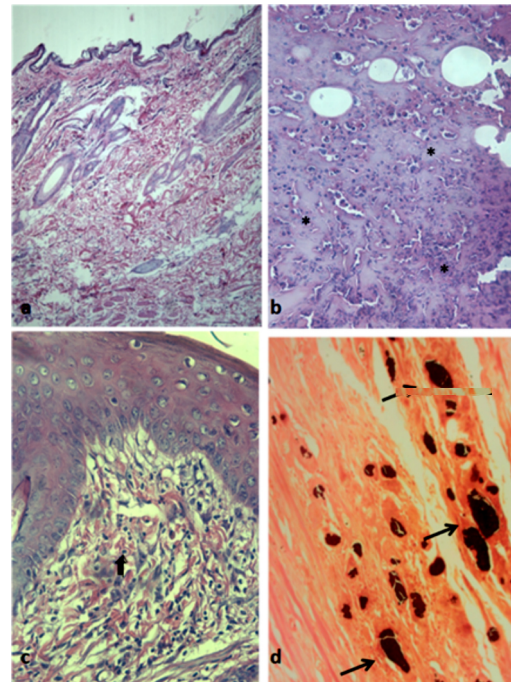


Figura 3. Microscopia de pele de coelhos da Nova Zelândia inoculados com veneno de *Loxosceles laeta* (C+) e tratados com dapsona (DAP), células-tronco mesenquimais (CTMs) ou em associação tanto com CTMs quanto com DAP (CTMs + DAP). (a) Pele normal mostrando integridade das células epidérmicas e dérmicas (C-) (HE, 100x). (b) Presença de crosta necrótica na pele de coelhos envenenados que receberam PBS (C+) (*) (HE, 200x). (c) Presença de discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta) em animais tratados com dapsona (DAP) (HE, 200x). (d) Múltiplas manchas escuras podem ser observadas na derme, sinalizando calcificação tecidual na pele de animais tratados com PBS (setas) (Von Kossa, 100x).

Em contrapartida, os infiltrados neutrofílicos também foram mais discretos nos grupos que apresentaram feridas menos intensas, como ocorreu no grupo tratado com DAP, CTMs e CTMs + DAP. Esse fato pode ser explicado pelo efeito antiagregação leucocitária da dapsona, já descrito por alguns autores (31,32,33,34). Além disso, as CTMs possuem efeito imunomodulador que pode atenuar a inflamação e reprogramar o sistema imunológico local, favorecendo o reparo tecidual e inibindo a fibrose exuberante (35,36).

As observações feitas nos grupos que receberam CTM provavelmente ocorreram devido ao estímulo positivo nas células locais, como queratinócitos e células progenitoras (27). As CTMs têm a capacidade de interagir com o microambiente local, atraindo células progenitoras, diferenciando-se em outros tecidos e produzindo uma série de fatores solúveis, como citocinas e fatores de crescimento que influenciam positivamente na cicatrização de feridas crônicas, como as observadas no loxoscelismo cutâneo (27). Além disso, as CTMs têm efeito imunomodulador na inflamação local da pele, sugerindo

que podem ser usadas em pacientes com feridas de difícil cicatrização⁽²⁸⁾.

Avaliação de fibras colágenas

Dois métodos diferentes foram utilizados para avaliar a deposição de fibras colágenas durante o processo

de cicatrização de feridas: identificação de colágeno total pela coloração do Tricrômico de Masson e identificação e quantificação de fibras maduras e imaturas pela coloração Picro-Sirius Red (Fig 4 e 5). Essas análises de colágeno são importantes para avaliar o estágio cicatricial, pois é quando se observa a organização colágena e a substituição gradual de fibras imaturas por maduras⁽³⁷⁾.

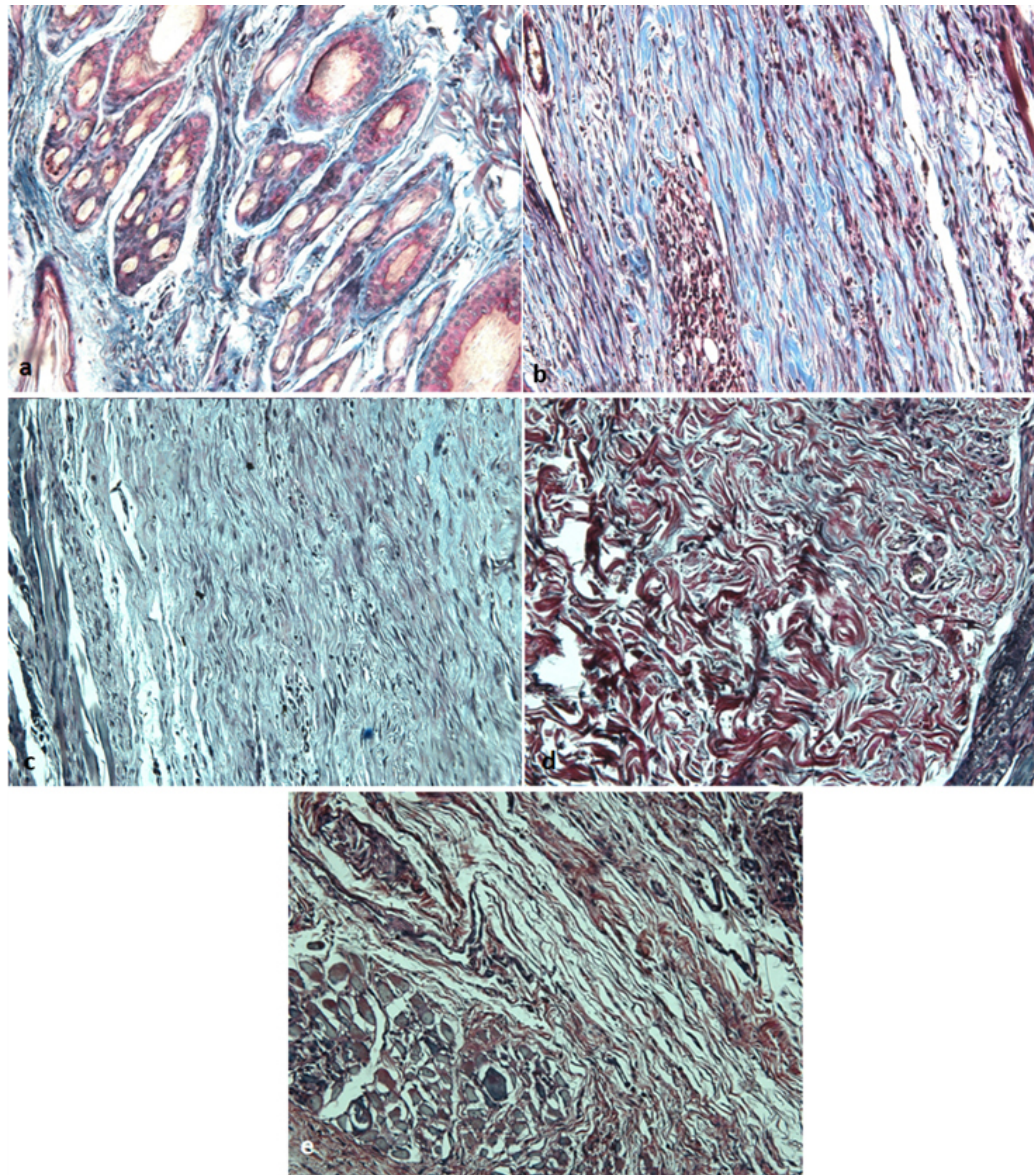


Figura 4. Análise da deposição de colágeno através do Tricrômico de Masson de pele de coelhos da Nova Zelândia inoculados com veneno de *Loxosceles laeta* e tratados com dapsona (DAP), células-tronco mesenquimais (CTMs) ou em associação tanto de CTMs quanto de DAP (CTMs +DAP). **(a)** Amostra de uma pele de coelho do grupo controle (C-) (200x). **(b)** Padrão de deposição de colágeno após envenenamento por *Loxosceles laeta* (C+) (*) (200x). **(c)** Deposição de colágeno em coelhos envenenados e tratados com dapsona (DAP) (*) (200x). **(d)** Deposição de colágeno em coelhos envenenados e tratados com células-tronco mesenquimais (CTMs) (*) (200x). **(e)** Deposição de colágeno em coelhos envenenados e tratados com DAP e CTMs (DAP- CTMs) (*) (200x).

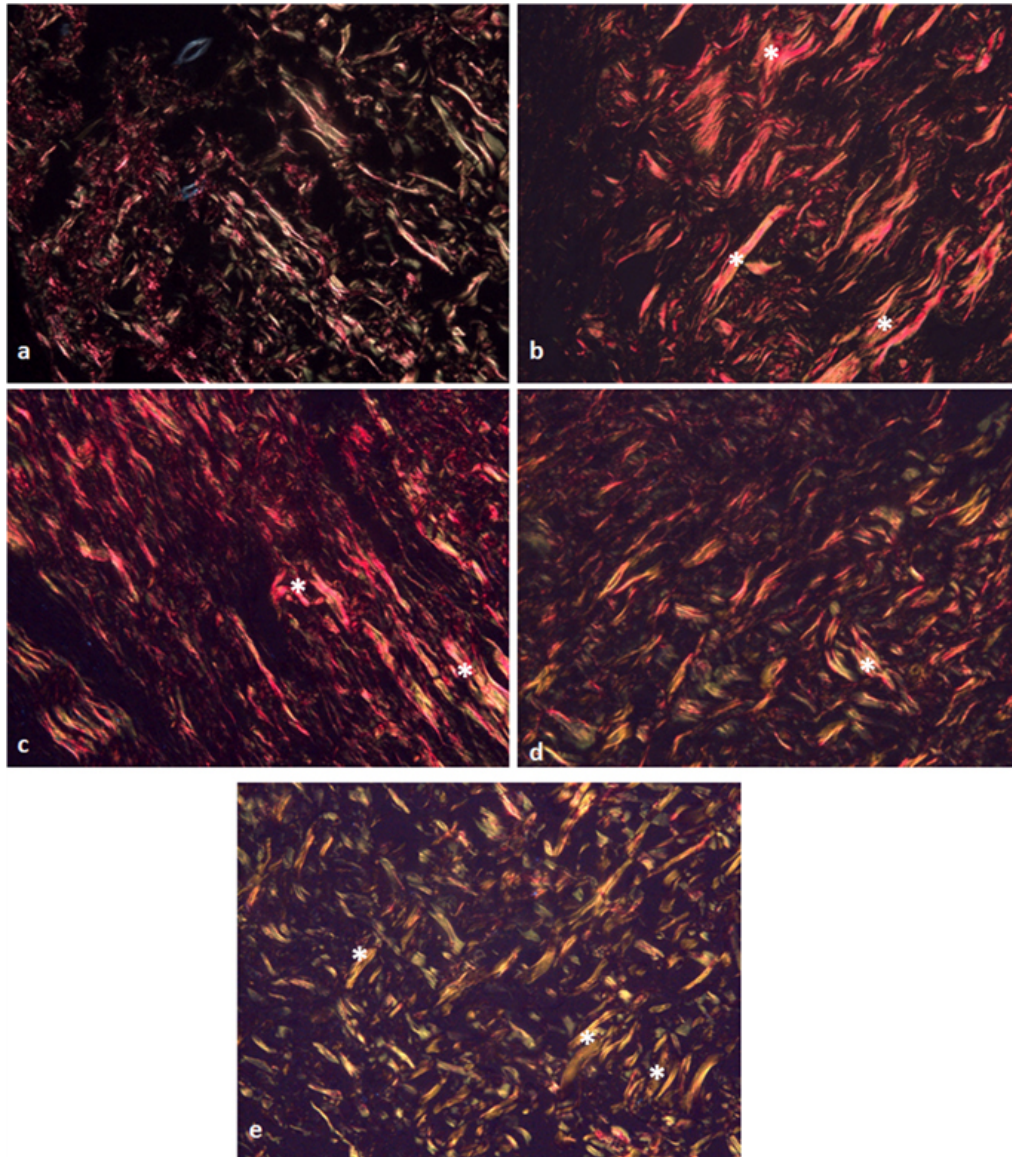


Figura 5. Análise da deposição de colágeno através da coloração de Prico-sirius em pele de coelhos da Nova Zelândia inoculados com veneno de *Loxosceles laeta* e tratados com dapsona (DAP), células-tronco mesenquimais (CTMs) ou em associação tanto de CTMs quanto de DAP (CTMs +DAP). **(a)** Amostra de uma pele do grupo controle (C-) (200x), **(b)** Padrão de deposição de colágeno após envenenamento por *Loxosceles laeta* (C+) (*) (200x), **(c)** Deposição de colágeno em coelhos envenenados e tratados com dapsona (DAP) (*) (200x), **(d)** Deposição de colágeno em coelhos envenenados e tratados com células-tronco mesenquimais (CTMs) (*) (200x), **(e)** Deposição de colágeno em coelhos envenenados e tratados com DAP e CTMs (DAP-CTMs) (*) (200x).

Os animais submetidos ao tratamento com DAP e CTMs apresentaram maior número de fibras colágenas totais em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Tabela I e Figura 4). Isso pode representar uma ação sinérgica entre CTMs e DAP, aumentando o estímulo para a deposição total de colágeno.

Avaliação imuno-histoquímica da angiogênese

Não houve diferença estatística perceptível na área

ocupada pelos vasos sanguíneos entre o grupo controle e todos os tratamentos testados. A angiogênese é um processo da fase proliferativa da cicatrização e muito importante na evolução da cicatrização de feridas, ocorrendo a partir de capilares intactos ou recém-lesados. Este evento é modulado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), produzido por células endoteliais, macrófagos e células epidérmicas ativas⁽³⁸⁾. É geralmente aceito que as CTMs estimulam a angiogênese por meio da quimiotaxia de macrófagos e

estimulação de células endoteliais por fatores pró-angiogênicos, como o VEGF-A. O fato de não haver diferença observável na neovascularização entre os diferentes grupos pode ser explicado pelo momento da coleta da amostra. Um estudo sobre feridas em cães após tratamento com CTMs corrobora essa hipótese. Neste estudo, nenhuma diferença no número de vasos sanguíneos foi observada 14 dias após o tratamento com células-tronco, mas no dia 21, uma diferença estatística nos grupos tratados foi observada ⁽²⁸⁾.

Tabela I. Médias das áreas ocupadas em pixels por colágeno na pele de coelhos da Nova Zelândia segundo os diferentes tipos de tratamentos instituídos após coloração com Tricrômico de Masson em amostras coletadas 12 dias após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*

Grupos	Colágeno total
Controle negativo	396125,70 A
Controle positivo (<i>L. laeta</i>)	582954,9 AB
Dapsona	679998,50 AB
CTMs	590493,40 AB
Dapsona + CTMs	742477,60 B

CTMs: Células-tronco mesenquimais. Letras maiúsculas diferentes representam valores estatísticos diferentes nas colunas pelo teste de Tukey onde $p < 0,05$.

Conclusões

A concentração de veneno de *L. laeta* utilizada neste estudo (20 µg) foi capaz de induzir uma lesão dermonecrotica significativa em coelhos. As CTMs podem aumentar a inflamação inicial após a aplicação nos primeiros dias, no entanto, com o passar do tempo, essas contribuem para a cicatrização da ferida. A análise histopatológica mostrou lesão tecidual diminuída e inflamação menos intensa nos grupos DAP e CTMs sinalizando uso potencial de CTMs em terapias regenerativas após acidentes loxoscélicos. Apesar de poucos parâmetros apresentarem significância estatística, o tratamento com DAP + CTMs revelou potencial para melhorar a deposição de colágeno. Estudos adicionais podem fornecer mais evidências e são necessários para definir CTMs e sua associação com a dapsona como possíveis opções de tratamento para lesões cutâneas de *Loxosceles*.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuição dos autores

Conceituação: M.M. Melo, C.D.C. Olórtgui e A.M. Goes. **Curadoria de dados:** G.C. Martins, M.S.O. Barreto, A.F.M. Botelho e C. Gamba. **Análise formal:** G.C. Martins. **Aquisição de financiamento:** M.M. Melo. **Investigação:** G.C. Martins, M.S.O. Barreto, A.F.M. Botelho, C. Gamba e G.D. Cassali. **Metodologia:** M.M. Melo, C.D.C. Olórtgui, A.M. Goes e G.D. Cassali.

Gerenciamento do projeto: M.M. Melo. **Recursos:** M.M. Melo, C.D.C. Olórtgui, A.M. Goes e G.D. Cassali. **Software:** G.C. Martins. **Supervisão:** M.M. Melo. **Validação:** M.M. Melo, C.D.C. Olórtgui e A.M. Goes. **Visualização:** G.C. Martins, A.F.M. Botelho e C.G. Duarte. **Redação (esboço original):** G.C. Martins, A.F.M. Botelho, C.G. Duarte, B.S. Blanco e A.C.V. Bicalho. **Redação (revisão e edição):** G.C. Martins, M.M. Melo, A.F.M. Botelho e C.G. Duarte.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (concessão 308754/2021-2).

Referências

- Andrade RMG, Lourenço WR, Tambourgi DV. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, sicariidae). 2000. Journal of Arachnology. 2000; 28, 245-247.
- Malaque CMS, Castro-Valencia JE, Cardoso JLC, França FOS, Barbaro K, Fan HW. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2002; 44,139-143. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652002000300005>.
- Miranda, ALS, Guerra-Duarte C., Lima, SA, Chávez-Olórtgui C, Soto-Blanco B. History, challenges and perspectives on *Loxosceles* (brown spiders) antivenom production in Brazil. Toxicon. 2021, 40-45. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.01.004>
- Silva PH, Silveira RB, Appel MH, Mangili OC, Gremisk W, Veiga SS. Brown spiders and loxoscelism. Toxicon. 2004.44, 693-709. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>.
- Smith CW, Micks DW. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider. Laboratory Investigation 1970. 22, 90-93.
- Tambourgi DV, Gonçalves-de-Andrade RM, van den Berg CW. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. Toxicon. 2010. 15;56(7):1113-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>.
- Malaque CMS, Santoro ML, Cardoso JL, Conde MR, Novaes CTG, Risk JY, França FOS, Medeiros CR, Fan HW. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. Toxicon. 2011. 58, 664-671. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.011>.
- Barbaro KC, Knysak I, Martins R, Hogan C, Winkel K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. Toxicon. 2005. 45, 489-499. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.009>.
- Ministério da saúde, brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: assessoria de comunicação e educação em saúde – Fundação Nacional de Saúde. 2001. 45-56.
- Peterson ME. Brown Spider Envenomation. Clinical techniques in Small Animal Practice. 2006. 21, 191-193. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2006.10.004>.
- Pauli I, Minozzo JC, Silva PH, Chaim OM, Veiga SS. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spi-

- der (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon*. 2009. 53, 660-671. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.033>.
12. Costa TGF, Costal-Oliveira F, de Assis TCS, Lima SA, Martins CA, Finco AB, Veiga SS, Soccol VT, Machado-de-Ávila RA, Figueiredo LFM, Minozzo JC, Kalapothakis E, Guerra-Duarte C, Alvarenga LM, Chávez-Olórtegui C. Engineered antigen containing epitopes from *Loxosceles* spp. spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3) against astacin-like metalloproteases. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Nov 1;162:490-500. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.176>.
13. Saavedra-Langer R, Costa TGF, Lima SA, Costal-Oliveira F, Martins CA, Machado-de-Ávila RA, Minozzo JC, Soccol VT, Guerra-Duarte C, Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C. A prokaryote system optimization for rMEPLox expression: A promising non-toxic antigen for *Loxosceles* antivenom production. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021 Sep 30;187:66-75. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.042>.
14. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*. 2005. 34, 415-423. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x>.
15. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2001. 226, 507-520.
16. Jeong JH. Adipose Stem cells and skin repair. *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2010. 5, 137-140.2010.
17. Gaur M, Dobke M, Lunyak VV. Mesenchymal stem cells from adipose tissue in clinical applications for dermatological indications and skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. 18, 208. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18010208>.
18. Kim, W., Park, B., Sung, J., Yang, J., Park, S., Kwak, S., Park, J. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*. 2007. 48, 15-24. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.05.018>.
19. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995. 80, 2511-2517. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jcem.80.8.7629252>.
20. Phillips S, Kohn M, Baker D, Vander Leest R, Gomez H, McKinney P, McGoldrick J, Brent J. Therapy of brown spider envenomation: a controlled trial of hyperbaric oxygen, dapsone, and cyproheptadine. *Annals of Emergency Medicine*. 1995 Mar;25(3):363-8. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0196-0644\(95\)70296-2](https://doi.org/10.1016/s0196-0644(95)70296-2). PMID: 7864478.
21. Oliveira ST, Leme MC, Pippi NL, Raiser AG, Manfron MP. Preparations of comfrey (*Symphytum officinale*) on cutaneous wound healing in rats. *Revista da FZVA*. 2000. 7, 65-74
22. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007. 25, 2648-2659.
23. Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, Wang Y, Hu D. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Research and Therapy*. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0240-9>
24. Ferrara GIS, Fernandes-Pedrosa MF, Azevedo ILMJ, Andrade RMG, Portaro FCV, Almeida DM, Murakami M, Arni RK, Berg CW, Ho L, Tambourgi DV. Smase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon*. 2009. 53, 743-753. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.013>.
25. Elston DM, Miller SD, Young RJ, Eggers J, Mcglasson D, Schmidt WH, Bush A. Comparison of colchicine, dapsone, triamcinolone, and diphenhydramine therapy for the treatment of brown recluse spider envenomation. *Archives of Dermatology*. 2005. 141, 595-597. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archderm.141.5.595>.
26. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*. 2007. 213, 341-347. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.21200>.
27. Harman RJ. Stem cell therapy in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*. 2013. 24, 90-e24. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vde.12000>.
28. Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung DI, Park HM. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary Dermatology*. 2013. 24, 242-253. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vde.12011>.
29. Ospedal KZ, Appel MH, Neto JF, Mangili OC, Sanches V, Gremski W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *International Journal of Experimental Pathology*. 2002. 83, 287-294.
30. Maynor ML, Moon RE, Klitzman B, Fracica PJ, Canada A. Brown recluse spider envenomation: a prospective trial of hyperbaric oxygen therapy. *Academic Emergency Medicine*. 1997.4, 184-192.
31. Rees RS, Altenbern DP, Lynch JB, King Jr LE. Brown recluse spider bites. A comparison of early surgical excision versus dapsone and delayed surgical excision. *Annals of Surgery*. 1985. 202, 659-663.
32. Booth SA, Moody CE, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function. *Journal of Investigative Dermatology*. 1992. 98, 135-40.
33. Barret SM, Jenkins MR, Fisher DE. Dapsone or electric Shock therapy of brown recluse spider envenomation? *Annals of Emergency Medicine*. 1994. 24, 21-25.
34. Hogan CJ, Barbaro KC, Winkel K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Annals of Emergency Medicine*. 2004. 44, 608-624. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0196064404013149>.
35. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007. 110, 3499-3506. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716>.
36. Jackson WM, Nesti LJ, Tuan, RS. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cell Research and Therapy*. 2012. 3, 1-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/scrt111>.
37. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research* 2012. 49, 35-43. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000339613>.
38. Hosgood G. Reparo de Feridas e Resposta Tecidual Específica à Lesão. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. New York: Elsevier Science. 2003. Cap. 4, 66-86.