

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética**

Débora Priscila Larangote de Oliveira

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *LOXOSCELES***  
***SIMILIS*: Descoberta de novas toxinas e estudo funcional das Loxtox recombinantes s1A**  
**e s11A**

Belo Horizonte

2025

Débora Priscila Larangote de Oliveira

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *LOXOSCELES*  
*SIMILIS*: Descoberta de novas toxinas e estudo funcional das Loxtox recombinantes s1A  
e s11A**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, com o requisito parcial para a obtenção de título de Doutora em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte

2025

043

Oliveira, Débora Priscila Larangote de.

Análise transcriptômica da glândula de veneno de *Loxosceles similis*: descoberta de novas toxinas e estudo funcional das loxtox recombinantes s1a e s11a [manuscrito] / Débora Priscila Larangote de Oliveira. – 2025.

167 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Aranhas. 3. Picada de Aranha. 4. *Loxosceles similis*. 5. Venenos de Aranha. I. Kalapothakis, Evanguedes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**"Análise Transcriptômica da Glândula de Veneno de *Loxosceles Similis*: Descoberta de Novas Toxinas e Estudo Funcional das Loxtox Recombinantes S1a e S11a"**

**Débora Priscila Larangote de Oliveira**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Evanguedes Kalapothakis - Orientador

UFMG

Juliana da Silva Martins Pimentel

UFMG

Daniel Cardoso de Carvalho

PUC Minas

Luciana Souza de Oliveira

FUNED

Luiza Helena Gremski

UFPR

Belo Horizonte, 28 de novembro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Souza de Oliveira, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana da Silva Martins Pimentel, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 01/12/2025, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cardoso de Carvalho, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiza Helena Gremski, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Professor do Magistério Superior**, em 09/12/2025, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4783249** e o código CRC **147E37A8**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA - SECRETARIA

### ATA DE DEFESA DE TESE

<b>Débora Priscila Larangote de Oliveira</b>	<b>201/2025</b> <b>entrada2º/2021</b> <b>CPF: 123.699.666-61</b>
--	--

Às nove horas do dia **28 de novembro de 2025**, reuniu-se a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Análise Transcriptômica da Glândula de Veneno de *Loxosceles Similis*: Descoberta de Novas Toxinas e Estudo Funcional das Loxtox Recombinantes s1A e s11A**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Evanguedes Kalapothakis**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>Indicação</b>
Dr. Evanguedes Kalapothakis	UFMG	Aprovada
Dra. Juliana da Silva Martins Pimentel	UFMG	Aprovada
Dr. Daniel Cardoso de Carvalho	PUC Minas	Aprovada
Dra. Luciana Souza de Oliveira	FUNED	Aprovada
Dra. Luiza Helena Gremski	UFPR	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 28 de novembro de 2025.**

Dr. Evanguedes Kalapothakis - Orientador

Dra. Juliana da Silva Martins Pimentel

Dr. Daniel Cardoso de Carvalho

Dra. Luciana Souza de Oliveira

Dra. Luiza Helena Gremski

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Souza de Oliveira, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana da Silva Martins Pimentel, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 01/12/2025, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cardoso de Carvalho, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiza Helena Gremski, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Professor do Magistério Superior**, em 09/12/2025, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4781985** e o código CRC **915A791A**.

Dedico esta tese aos meus pais, Walter Luiz de Oliveira e Rosa Malta Larangote Oliveira, que sempre acreditaram em mim, e ao meu esposo, José Vitor Lima, pelo amor, paciência e apoio constante em cada etapa desta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde e por me conceder forças para seguir mesmo diante dos desafios.

Ao meu orientador, Evanguedes Kalapothakis, pela orientação, paciência, confiança e por todas as oportunidades de aprendizado científico e pessoal ao longo desta trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFMG pela estrutura e apoio institucional.

À minha família, pelo amor incondicional, compreensão e incentivo constante. Ao meu esposo José Vitor pelo amor e paciência em todos os momentos, e aos meus pais, Walter e Rosa, por acreditarem em mim e me apoiarem em cada passo,

Aos colegas da PHT, pela amizade, colaboração e pelas inúmeras discussões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que estiveram presentes nos momentos de alegria e de dificuldade, tornando esta jornada mais leve e significativa.

A CAPES, pelo apoio financeiro concedido, sem o qual este trabalho não seria possível.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste Doutorado, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As aranhas-marrons do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) ocorrem em regiões tropicais e temperadas ao redor do mundo, sendo responsáveis por acidentes que resultam em loxoscelismo, uma condição reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde pública negligenciado. No Brasil, o número de casos tem aumentado, especialmente nas regiões Sul e Sudeste, embora apenas cerca de 23% sejam notificados, o que evidencia falhas nos sistemas de vigilância e diagnóstico. A *Loxosceles similis*, uma espécie de importância médica, possui ampla distribuição e notável capacidade de adaptação, sendo encontrada tanto em ambientes naturais, como em cavernas e troncos de árvores, quanto em áreas urbanas, incluindo residências. Acidentes geralmente ocorrem quando as aranhas, escondidas em roupas ou calçados, são pressionadas contra o corpo, produzindo picadas inicialmente indolores, cuja dor e sintomas surgem após algumas horas, retardando a procura por atendimento e o início do tratamento adequado. A análise transcriptômica da glândula de veneno de *L. similis*, realizada por meio de tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), proporcionou uma visão abrangente do perfil gênico dessa espécie, permitindo identificar grupos de genes expressos e moléculas potencialmente implicadas na toxicidade do veneno. Foram identificadas novas sequências de Loxtox das subfamílias s1A e s11A, além de metaloproteases, hialuronidase, toxinas inseticidas e fosfolipase A<sub>2</sub>. As isoformas recombinantes recLoxtox s1A (~34,2 kDa) e recLoxtox s11A (~34,9 kDa) foram expressas e purificadas, permitindo a caracterização funcional de suas atividades biológicas. Além da ação dermonecrótica já conhecida, a recLoxtox s1A apresentou toxicidade em larvas de *Tenebrio molitor* e sobre vasos sanguíneos da membrana corioalantoide (CAM). Ademais, as toxinas recombinantes apresentaram efeitos sobre a atividade de plaquetas lavadas, sugerindo que sua ação possa envolver vias dependentes de integrinas ou de glicoproteínas de membrana, como o receptor GPVI. A abordagem empregada neste estudo amplia o entendimento sobre a diversidade de toxinas produzidas por aranhas do gênero *Loxosceles* e fornece subsídios relevantes para pesquisas de cunho evolutivo, biotecnológico e voltadas à saúde pública. As descobertas obtidas revelam uma ampla variedade de toxinas expressas na glândula de veneno de *L. similis*, indicando uma complexa rede de moléculas envolvidas nos efeitos locais e sistêmicos do envenenamento. Por fim, o estudo aprofunda a compreensão dos efeitos biológicos das toxinas Loxtox e contribui para o desenvolvimento de abordagens experimentais alternativas ao emprego de vertebrados em pesquisas científicas.

**Palavras-chave:** *Loxosceles similis*, NGS, Análise transcriptômica, Loxtox, Fosfolipase-D

## ABSTRACT

Brown spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) occur in tropical and temperate regions around the world and are responsible for accidents that result in loxoscelism, a condition recognized by the World Health Organization (WHO) as a neglected public health problem. In Brazil, the number of cases has been increasing, especially in the South and Southeast regions, although only about 23% are reported, which highlights flaws in surveillance and diagnostic systems. *Loxosceles similis*, a species of medical importance, is widely distributed and remarkably adaptable, found in natural environments such as caves and tree trunks, as well as in urban areas, including homes. Accidents usually occur when spiders, hidden in clothing or shoes, are pressed against the body, producing initially painless bites, whose pain and symptoms appear after a few hours, delaying the search for care and the start of appropriate treatment. In this study, transcriptomic analysis of the venom gland of *L. similis*, performed using Next-Generation Sequencing (NGS), allowed for comprehensive characterization of the main sets of expressed genes and identification of molecules potentially involved in venom toxicity. New Loxtox sequences from the s1A and s11A subfamilies were identified, in addition to metalloproteinases, hyaluronidase, insecticidal toxins, and phospholipase A<sub>2</sub>. The recombinant isoforms recLoxtox s1A (~34.2 kDa) and recLoxtox s11A (~34.9 kDa) were expressed and purified, allowing the functional characterization of their biological activities. In addition to its known dermonecrotic action, recLoxtox s1A showed toxicity in *Tenebrio molitor* larvae and on blood vessels of the chorioallantoic membrane (CAM). Furthermore, the recombinant toxins had effects on the activity of washed platelets, suggesting that their action may involve pathways dependent on integrins or membrane glycoproteins, such as the GPVI receptor. The approach employed in this study broadens our understanding of the diversity of toxins produced by spiders of the genus *Loxosceles* and provides relevant insights for evolutionary, biotechnological, and public health research. The findings reveal a wide variety of toxins expressed in the venom gland of *L. similis*, indicating a complex network of molecules involved in the local and systemic effects of envenomation. Furthermore, the study deepens the understanding of the biological effects of Loxtox toxins and contributes to the development of alternative experimental approaches to the use of vertebrates in scientific research.

**Key words:** *Loxosceles similis*, NGS, Transcriptomic analysis, Loxtox, Phospholipase-D

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição espacial dos acidentes por <i>Loxosceles</i> nos anos de 2017 a 2021 .....	19
Figura 2 - Percentual de acidentes com <i>Loxosceles</i> por local da picada .....	20
Figura 3 - Registro de <i>Loxosceles</i> em ambiente cavernícola na Gruta da Lapinha, MG. ....	21
Figura 4 - Espécies de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> de importância médica no Brasil .....	22
Figura 5 - Resumo esquemático dos principais componentes tóxicos do veneno de <i>Loxosceles</i> e seus efeitos no loxoscelismo .....	25
Figura 6 - Exemplares macho e fêmea da espécie <i>L. similis</i> .....	26
Figura 7 - Tecidos e órgãos afetados pelo loxoscelismo sistêmico e cutâneo .....	37
Figura 8 - Variação temporal do número de acidentes envolvendo aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> nas cinco regiões do Brasil .....	38
Figura 9 - Loxoscelismo cutâneo .....	45
Figura 10 - Fluxograma do processo de construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento .....	48
Figura 11 - Representação esquemática dos pontos de aplicação das toxinas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A .....	57
Figura 12 - Alinhamento múltiplo de sequências do grupo s1A das Loxtox .....	67
Figura 13 - Alinhamento múltiplo de sequências do grupo s11A das Loxtox .....	68
Figura 14 - Sequência de cDNA e aminoácidos da LsPLA2-1 .....	70
Figura 15 - Alinhamento da LsPLA2-1 com sequências de PLA2 de outras espécies de aranhas .....	73
Figura 16 - Alinhamento da LsPLA2-1 com sequências de PLA2 de escorpiões .....	74
Figura 17 - Análise evolutiva de metaloproteases de <i>Loxosceles</i> pelo método de Máxima Verossimilhança .....	79
Figura 18 - Alinhamento múltiplo de sequências das LALPs de <i>L. intermedia</i> e das novas metaloproteases de <i>L. similis</i> .....	81
Figura 19 - Alinhamento de LsTx2, LsTx3 e LsTx4 de <i>L. similis</i> com LiTx1 e LiTx3 de <i>L. intermedia</i> .....	87
Figura 20 - Alinhamento de LsTx1 <i>L. similis</i> com LiTx2 de <i>L. intermedia</i> .....	87
Figura 21 - Alinhamento múltiplo das sequências maduras de LsTx e LiTx .....	88
Figura 22 - Alinhamento múltiplo da sequência de LsHyal-1 com hialuronidases de outros venenos de aracnídeos .....	92
Figura 23 - Análise em gel de SDS-PAGE 12% do produto de expressão das proteínas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A .....	94
Figura 24 - Purificação da proteína recombinante recLoxtox s1A .....	95

Figura 25 - Teste de solubilização da proteína recombinante recLoxtox s11A proveniente da fração insolúvel .....	96
Figura 26 - Purificação da proteína recombinante recLoxtox s11A .....	97
Figura 27 - Evolução temporal das lesões cutâneas induzidas por injeções intradérmicas das toxinas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em coelho .....	98
Figura 28 - Evolução diária da lesão cutânea induzida em coelho .....	99
Figura 29 - Efeitos da toxina recombinante recLoxtox s1A sobre larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	100
Figura 30 - Taxa de sobrevivência de <i>Tenebrio molitor</i> após desafio com diferentes concentrações da toxina recombinante recLoxtox s1A .....	102
Figura 31 - Efeito da toxina recombinante recLoxtox s1A sobre a vascularização da CAM....	103
Figura 32 - Avaliação do efeito sobre plaquetas das enzimas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A .....	105
Figura 33 - Distribuição assimétrica dos fosfolipídios na membrana plasmática das plaquetas.....	107
Figura 34 - As três etapas da atividade plaquetária durante a hemostasia primária .....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Loxosceles</i> registradas no Brasil segundo o <i>World Spider Catalog</i> (2025) .....	23
Tabela 2 - Resumo cronológico dos achados experimentais relacionados à caracterização do veneno de <i>L. similis</i> .....	27
Tabela 3 - Agrupamento das toxinas da família Loxtox identificadas em <i>L. similis</i> .....	29
Tabela 4 - Proteínas recombinantes Loxtox e suas atividades biológicas .....	30
Tabela 5 - Notificações de acidentes por <i>Loxosceles</i> ocorridos no Brasil entre 2000 e 2024.....	39
Tabela 6 - Manifestações clínicas do loxoscelismo .....	44
Tabela 7 - Exemplos de padrões utilizados no PHT-KAPPA .....	53
Tabela 8 - Fluxo de processamento das leituras de RNA-Seq de <i>L. similis</i> .....	61
Tabela 9 - Total de sequências putativas identificadas no transcriptoma de <i>L. similis</i> .....	63
Tabela 10 - Sequência primária e características conservadas de novos membros da família Loxtox .....	65
Tabela 11 - Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências pertencentes ao grupo s1 de Loxtox .....	69
Tabela 12 - Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências pertencentes ao grupo s11 de Loxtox .....	69
Tabela 13 - Similaridade da sequência LsPLA <sub>2</sub> -1 com proteínas homólogas identificadas por meio do BLASTP .....	71
Tabela 14 - Metaloproteases (MPs) putativas da glândula de veneno de <i>L. similis</i> .....	76
Tabela 15 - Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências pertencentes ao grupo s11 de Loxtox .....	78
Tabela 16 - Lista de proteínas putativas do grupo de Toxinas Inseticidas na glândula de veneno de <i>L. similis</i> .....	86
Tabela 17 - Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências LsTx com toxinas inseticidas de <i>L. intermedia</i> .....	88
Tabela 18 - Sequência putativa de hialuronidase encontrada na glândula de veneno de <i>L. similis</i> .....	90
Tabela 19 - Efeito de diferentes concentrações das toxinas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A sobre a sobrevivência e mobilidade de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	101
Tabela 20 - Efeito de diferentes concentrações maiores da toxina recombinante recLoxtox s1A sobre a sobrevivência e mobilidade de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD - ácido-citrato-dextrose

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CAM - Membrana Corioalantoica

ESP - Espontânea

FC -Fosfatidilserina

FE - Fosfatidiletanolamina

FG - Fibrinogênio

FIV - Feritização *in vitro*

FS - Fosfatidilsetina

GP - Glicoproteína

ICK - Nó de Cisteína Inibidor (do inglês *Inhibitor Cystine Knot*)

ID - Identidade

HYAL - Hialuronidase

ICK - *Inhibitor Cystein Knot*

LALP - *Loxosceles* astacin-like metalloprotease

LPA - Ácido Lisofosfatídico

MP - Metaloprotease

MMP - Metaloprotease de matriz

NaV - Canal de sódio dependente de voltagem

NGS - Sequenciamento de Nova Geração (do inglês *Next-Generation Sequencing*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PGE - Prostaglandina

PHTK - *software* PHT-KAPPA

PL - Plaquetas lavadas

PLD - Fosfolipase D

PPP - Plasma pobre em plaquetas

PRP - Plasma rico em plaquetas

QC - *Query cover*

ROS - Espécies reativas de oxigênio

Rpm - Rotações por minuto

RPKM - Leituras por Quilobase por Milhão (do inglês *Reads Per Kilobase Million*)

SIMIL. - Similaridade

SM - Esfingomiéline

SMase D - Esfingomielinase D

sPLA<sub>2</sub> - Fosfolipase A<sub>2</sub> secretada

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTP - Proteínas Tumorais Controladas por Tradução (do inglês *Translationally Controlled Tumor Proteins*)

TL% - Percentual de letalidade

vWf - Fator de *von Willebrand*

WHO - *World Health Organization*

WSC - *World Spider Catalog*

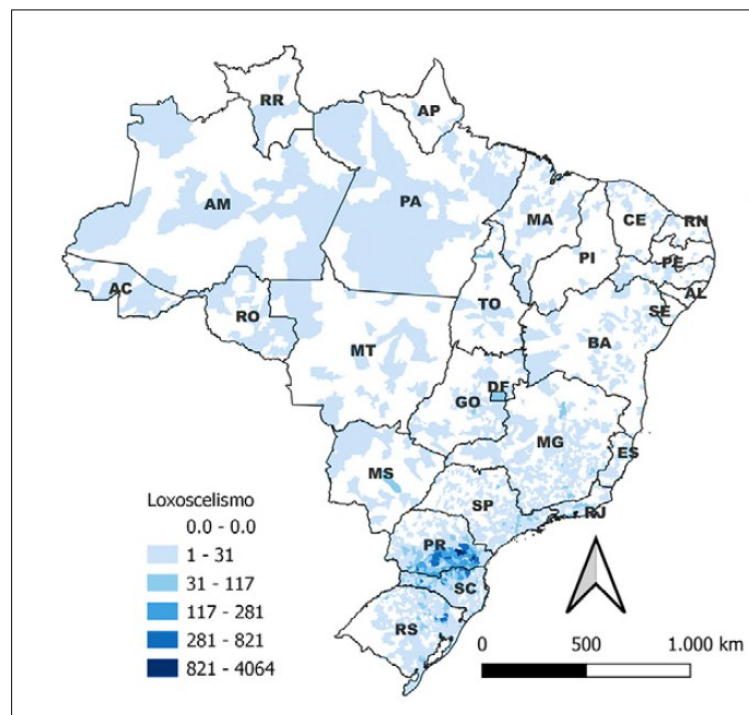
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 <i>Loxosceles spp.</i> : Características gerais das aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	22
1.2 Aspectos taxonômicos, biológicos e toxicológicos de <i>Loxosceles similis</i> .....	25
1.3 As Loxtox e sua importância para o Loxoscelismo .....	33
1.4 Diversidade enzimática do veneno de <i>Loxosceles</i> : além das Loxtox .....	34
1.5 Loxoscelismo: Tendências e impactos dos acidentes .....	36
1.6 Diagnóstico e abordagens terapêuticas do loxoscelismo: avanços e perspectivas .....	40
1.7 Manifestações clínicas do loxoscelismo com ênfase em <i>L. similis</i> .....	43
1.8 O transcriptoma como ferramenta de estudo e o NGS .....	47
<b>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO</b> .....	49
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	50
3.1 Objetivo geral .....	50
3.2 Objetivos específicos .....	50
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
4.1 Coleta das aranhas e extração do RNA .....	51
4.2 Construção da biblioteca de cDNA e Sequenciamento de Nova Geração .....	51
4.3 Análise bioinformática de dados de RNA-seq e montagem dos <i>contigs</i> .....	52
4.4 Anotação e buscas diretas por proteínas de interesse utilizando o <i>software</i> PHT-KAPPA (PHTK).....	52
4.5 Construção da Árvore Filogenética .....	54
4.6 Expressão e purificação das Loxtox s1A e s11A .....	54
4.7 Dosagem de proteínas .....	55
4.8 Eletroforese por SDS-PAGE .....	55
4.9 Efeitos cutâneos das toxinas recombinantes em coelho .....	56
4.10Ensaio de toxicidade de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em insetos (larvas de <i>Tenebrio molitor</i> ) .....	57
4.11Atividade enzimática de recLoxtox s1A sobre a membrana corioalantoica (CAM) de ovos de galinha .....	58
4.12Ensaio de agregação plaquetária .....	59
4.12.1 Plaquetas lavadas (PL) .....	59
4.12.2 Plasma rico em plaquetas (PRP) .....	60
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	60

5.1	Construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento NGS .....	60
5.2	Anotação dos <i>contigs</i> .....	61
5.3	Alinhamentos .....	64
5.3.1	Família Loxtox .....	64
5.3.2	Fosfolipase A <sub>2</sub> .....	70
5.3.3	Metaloproteases .....	75
5.3.4	Toxinas Inseticidas .....	84
5.3.5	Hialuronidasas .....	89
5.4	Expressão e purificação de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A .....	94
5.5	Efeitos cutâneos de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em coelho .....	97
5.6	Ensaio de toxicidade recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em insetos (larvas de <i>Tenebrio molitor</i> ) (Resultados preliminares) .....	99
5.7	Atividade enzimática de recLoxtox s1A sobre a membrana corioalantoica (CAM) de ovos de galinha (Resultados preliminares) .....	103
5.8	A atividade de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A na agregação plaquetária (Resultados preliminares) .....	104
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>109</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>110</b>
	<b>ANEXO I - Sequência das Loxtox previamente caracterizadas</b> .....	<b>132</b>
	<b>APÊNDICE I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)</b> .....	<b>135</b>
	<b>APÊNDICE II - Artigo publicado: “Molecular evidence of Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) in the venom of <i>Loxosceles similis</i>”</b> .....	<b>144</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, popularmente conhecidas como aranhas-marrons, pertencem à família Sicariidae e constituem um grupo que compreende aproximadamente 148 espécies (*World Spider Catalog, Version 26, 2025*), distribuídas em regiões de clima tropical e temperado nas Américas, Oceania, Ásia, África e Europa (Cárdenas *et al.*, 2017; Ministério da Saúde, 2025). *Loxosceles* é considerado um dos grupos de aranhas mais perigosos do mundo (Hauke & Herzig, 2017), e os acidentes envolvendo este gênero são reconhecidos como um problema de saúde pública na América do Sul, incluindo o Brasil, sendo as regiões Sul e Sudeste consideradas endêmicas para o loxoscelismo (Machado *et al.*, 2005; Haas *et al.*, 2013). A Figura 1 ilustra a distribuição espacial dos acidentes por *Loxosceles* no Brasil, entre os anos de 2017 e 2021 (Secretária de Vigilância em Saúde, 2022).

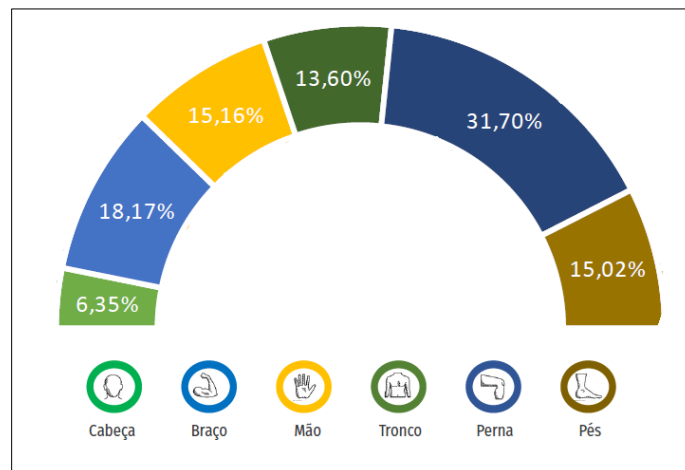


**Figura 1 - Distribuição espacial dos acidentes por *Loxosceles* nos anos de 2017 a 2021** - As áreas em tonalidades de azul representam a distribuição dos casos de loxoscelismo no território nacional, sendo que os tons mais escuros correspondem às regiões com maior número de registros. Figura adaptada do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde).

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde da última década indicam que as aranhas do gênero *Loxosceles* são responsáveis pela maioria dos casos registrados de envenenamento por espécies de aranhas de relevância médica no Brasil, correspondendo a aproximadamente 61% dos incidentes envolvendo espécies identificadas taxonomicamente. Em 2024, esses envenenamentos estiveram associados a 23 óbitos por agravo notificados, enquanto 20 já foram reportados ao final do terceiro trimestre de 2025 (Ministério da Saúde, 2025). Os acidentes

causados por essas aranhas podem resultar em danos locais, como lesões dermonecroticas, ou em comprometimentos sistêmicos, incluindo danos vasculares e insuficiência renal, condição conhecida como loxoscelismo. Essa condição é causada principalmente por um grupo de toxinas denominado Loxtox, que atua sobre diversos substratos, com destaque para os fosfolipídios (Binford and Wells, 2003; Kalapothakis *et al.*, 2007; Kusma *et al.*, 2008; Chaves-Moreira *et al.*, 2009; Chaim *et al.*, 2011).

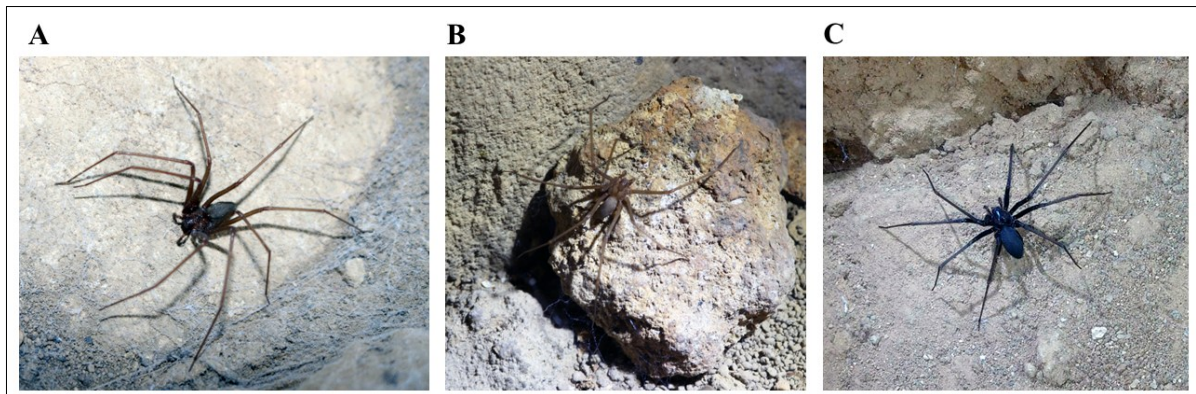
Os acidentes envolvendo as aranhas do gênero *Loxosceles* geralmente ocorrem quando esses animais se abrigam em roupas ou calçados e são comprimidos contra o corpo, sendo que cerca de 31% dos acidentes ocorrem por picadas nas pernas (Figura 2). O diagnóstico é realizado por meio da identificação da aranha e da análise das manifestações clínicas. No entanto, apenas 23% dos casos de loxoscelismo são efetivamente notificados (Lopes *et al.*, 2020). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a administração de soro antiveneno para o tratamento de casos moderados a graves; entretanto, essa medida não é completamente eficaz para o tratamento da dermonecrose ou dos efeitos sistêmicos na maioria dos pacientes (Hogan *et al.*, 2004). Além disso, os protocolos terapêuticos descritos na literatura ainda são controversos e podem exigir um longo período para apresentar eficácia (Lopes *et al.*, 2020), o que gera a necessidade de aprimorar e/ou desenvolver novos tratamentos.



**Figura 2 - Percentual de acidentes com *Loxosceles* por local da picada.** Figura adaptada do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde).

*Loxosceles similis* é uma das 21 espécies de *Loxosceles* que ocorrem no Brasil (Machado *et al.*, 2005; Chatzaki *et al.*, 2012; Chaves-Moreira *et al.*, 2017). Essa espécie é comumente encontrada habitando cavernas, incluindo locais de acesso turístico, como a Gruta da Lapinha, no estado de Minas Gerais (Figura 3), e cavernas turísticas do Mato Grosso do Sul (Andrade R.

M. G. *et al.*, 2001). A espécie em questão também já foi encontrada no interior de habitações humanas, conforme demonstrado em estudo publicado pelo nosso grupo em 2005, que documentou sua presença em residências na cidade de Belo Horizonte. A diversidade de habitats nos quais essa espécie é capaz de se estabelecer contribui para sua expansão, além de conferir um caráter potencialmente sinantrópico, fator que aumenta o risco de ocorrência do loxoscelismo.



**Figura 3 - Registro de *Loxosceles* em ambiente cavernícola na Gruta da Lapinha, MG.** – A, B e C espécimes de *Loxosceles* fotografadas na Gruta da Lapinha, uma caverna turística em Minas Gerais, Brasil. A variação na coloração da aranha pode estar relacionada a diferentes espécies ou ao momento em que ocorreu a última ecdise. Fonte: Elaborada pelo autor.

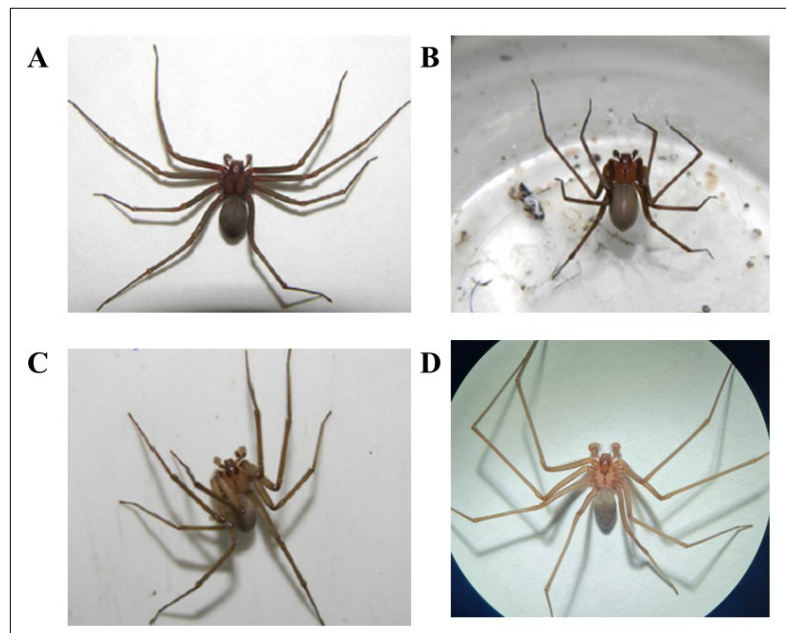
As informações sobre a biologia, o comportamento e a distribuição desses animais são essenciais para evitar equívocos na identificação e podem contribuir para o conhecimento geral das áreas de risco de acidentes, além de auxiliar na definição de medidas profiláticas a serem adotadas pela população local e por profissionais de saúde (Vetter, 2009). Estudos conduzidos por nosso grupo demonstraram que o veneno de *L. similis* apresenta propriedades biológicas semelhantes às de outras espécies de importância médica no Brasil, como *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Esses achados sugerem que acidentes envolvendo a espécie *L. similis* podem desencadear manifestações clínicas compatíveis com aquelas tipicamente observadas no loxoscelismo.

Algumas pesquisas têm demonstrado o potencial das proteínas recombinantes na caracterização das toxinas da família Loxtox (Kalapothakis *et al.*, 2002; Chaim OM *et al.*, 2011; Chatzaki M *et al.*, 2012; Leal HG *et al.*, 2020; Polli *et al.*, 2021, 2024). Essa família de enzimas, fortemente associada aos principais efeitos tóxicos do envenenamento por *Loxosceles*, constitui uma importante ferramenta para o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos de ação das toxinas. Nesse contexto, investigações adicionais sobre *L. similis* e outras espécies

potencialmente relevantes do ponto de vista médico, ainda pouco caracterizadas, são fundamentais para o avanço do conhecimento sobre o loxoscelismo e para o aprimoramento de métodos diagnósticos e terapêuticos mais específicos e adequados às diferentes regiões do país.

### 1.1 *Loxosceles* spp.: características gerais das aranhas do gênero *Loxosceles*

O gênero *Loxosceles* pertence à ordem Araneae, família Sicariidae, e é composto por pequenas aranhas, geralmente apresentando entre 1 e 5 cm, popularmente conhecidas como aranhas-marrons. Essas aranhas apresentam ampla distribuição mundial, sendo encontradas em regiões de clima tropical e temperado nas Américas, Oceania, Ásia, África e Europa (Cárdenas *et al.*, 2017). As espécies do gênero *Loxosceles* (Figura 4) apresentam coloração predominantemente marrom, que pode variar entre tons mais claros ou mais escuros, pernas finas e longas e cefalotórax caracteristicamente em formato de violino. Além disso, essas aranhas possuem seis olhos organizados em três pares dispostos em conformação de "U", característica fundamental para sua identificação. Atualmente, o gênero conta com cerca de 148 espécies descritas (World Spider Catalog 2025), 21 das quais são encontradas no Brasil, como mostrado na Tabela 1.



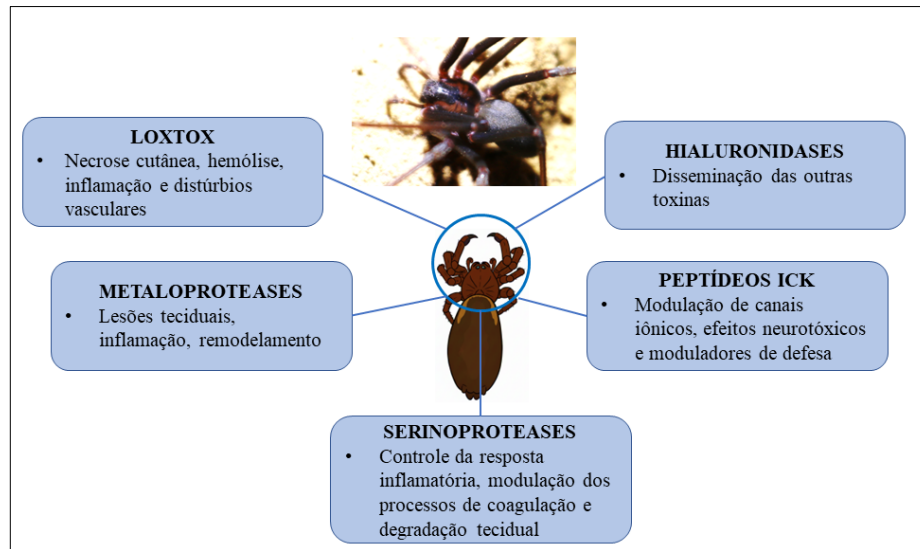
**Figura 4 - Espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* de importância médica no Brasil – (A) *Loxosceles gaucho*, (B) *Loxosceles intermedia*, (C) *Loxosceles laeta* e (D) *Loxosceles similis*. Fonte: (A, B e C) Gremski *et al.* (2014); (D) foto de Luana Varela (Fundação Ezequiel Dias).**

**Tabela 1. Espécies de *Loxosceles* registradas no Brasil segundo o *World Spider Catalog* (WSC - 2025).** ♂♀ indica identificação de espécimes machos e fêmeas, respectivamente. As identificações do WSC estão mostradas na última coluna.

<b>Espécies</b>	<b>Referência</b>	<b>Código WSC</b>
<i>Loxosceles adelaida</i>	(Gertsch, 1967b) ♂♀	002658
<i>Loxosceles amazonica</i>	(Gertsch, 1967b) ♂♀	002661
<i>Loxosceles anomala</i>	(Mello-Leitão, 1917) ♂♀	002662
<i>Loxosceles bodoquena</i>	(Bertani <i>et al.</i> , 2024) ♂♀	059876
<i>Loxosceles boqueirao</i>	(Bertani <i>et al.</i> , 2024) ♂♀	059874
<i>Loxosceles cardosoi</i>	(R. Bertani, von Schimonsky, <i>et al.</i> , 2018) ♂♀	050781
<i>Loxosceles carinhanha</i>	(R. Bertani, von Schimonsky, <i>et al.</i> , 2018) ♂♀	050784
<i>Loxosceles chapadensis</i>	(Bertani <i>et al.</i> , 2010) ♂♀	043503
<i>Loxosceles ericsoni</i>	(R. Bertani, von Schimonsky, <i>et al.</i> , 2018) ♂♀	050782
<i>Loxosceles gaucho</i>	(Gertsch, 1967a) ♂♀	002690
<i>Loxosceles hirsuta</i>	(Mello-Leitão, 1931) ♂♀	002695
<i>Loxosceles immodesta</i>	(Mello-Leitão, 1917) ♂♀	002697
<i>Loxosceles intermedia</i>	(Mello-Leitão, 1934) ♂♀	002700
<i>Loxosceles karstica</i>	(R. Bertani, von Schimonsky, <i>et al.</i> , 2018) ♂♀	050783
<i>Loxosceles laeta</i>	Nicolet, 1849 (Rodrigues & Dornelles, 2003) ♂♀	002708
<i>Loxosceles muriciensis</i>	(C. S. Fukushima <i>et al.</i> , 2017) ♂♀	049304
<i>Loxosceles niedeguidonae</i>	(Gonçalves-de-Andrade <i>et al.</i> , 2012) ♂♀	044669
<i>Loxosceles planetaria</i>	(Bertani <i>et al.</i> , 2024) ♂♀	059875
<i>Loxosceles puortoi</i>	(Martins <i>et al.</i> , 2002) ♂♀	037520
<i>Loxosceles similis</i>	(Moenkhaus, 1898) ♂♀	002735
<i>Loxosceles troglobia</i>	(Souza e Ferreira, 2018) ♂♀	050349
<i>Loxosceles willianilsoni</i>	(Fukushima <i>et al.</i> , 2017) ♂♀	049303

As aranhas-marrons são, em geral, sedentárias e não agressivas (R. M. G. De Andrade *et al.*, 1999), apresentando hábito noturno e preferência por ambientes secos e escuros, como sob troncos, galhos ou rochas, além de copas de árvores e cavernas, onde conseguem completar seu ciclo reprodutivo. Essa característica foi confirmada tanto por observações de campo quanto pela manutenção de espécimes de *L. similis* em laboratório, onde foram registrados padrões comportamentais compatíveis com os descritos para o gênero. Por outro lado, o potencial sinantrópico das *Loxosceles* favoreceu a colonização de ambientes urbanos, especialmente em áreas residenciais e no interior de domicílios, onde esses animais podem se abrigar em porões, sótãos, móveis, roupas, sapatos e outros espaços de fácil acesso (Málaque *et al.*, 2002). O sucesso das espécies sinantrópicas está principalmente associado à sua capacidade de dispersão e à elevada tolerância à escassez de alimento e água. Esse perfil ecológico, aliado ao aumento contínuo no número de acidentes reportados anualmente pelo Ministério da Saúde (TabNet / DATASUS, 2025), evidencia a necessidade de pesquisas mais detalhadas não apenas sobre as espécies atualmente reconhecidas como de importância médica, mas também sobre aquelas que, devido à sua fácil adaptação ao ambiente urbano, podem representar ameaça à saúde humana.

O veneno de *Loxosceles* consiste em uma complexa mistura de diferentes classes de toxinas e proteínas (Figura 5). Alguns destes componentes vêm sendo bem caracterizados biologicamente, trazendo assim informações sobre os mecanismos pelos quais o veneno causa seus efeitos deletérios (Chaves-Moreira *et al.*, 2017). Muitos estudos vêm abordando importantes toxinas para a patofisiologia dos efeitos do envenenamento por *Loxosceles*, como é o caso das toxinas da família Loxtox (Kalapothakis *et al.*, 2007), conhecidas por sua atividade característica em substratos dérmicos e seus efeitos no loxoscelismo sistêmico ((Barbaro *et al.*, 1996; Gremski *et al.*, 2023). Além das Loxtox, outras enzimas que compõem o veneno apresentam relevância para o loxoscelismo, como as metaloproteases, que apresentam atividade sobre fibrinogênio, fibronectina e caseína (Da Silveira *et al.*, 2007; Young & Pincus, 2001), hialuronidases, que podem atuar como um fator de espalhamento, facilitando a difusão das toxinas nos tecidos (Da Silveira *et al.*, 2007; Ferrer *et al.*, 2013) e as serinoproteases, que podem participar da degradação de proteínas da matriz extracelular e na modulação de processos inflamatórios e hemostáticos (Veiga *et al.*, 2000). Além disso, peptídeos inseticidas também vêm sendo descritos (de Castro *et al.*, 2004; Matsubara, *et al.*, 2017) o que possibilita a elucidação de novas moléculas com modos de ação específicos, úteis para o desenvolvimento de bioinseticidas mais eficientes, seletivos e ecologicamente sustentáveis. Estas descobertas tem sido atingidas principalmente através de estudos utilizando ferramentas de biologia molecular, como estudos de proteômicas, transcriptômica e também de expressão e purificação de toxinas recombinantes (Pedrosa *et al.*, 2002; Kalapothakis *et al.*, 2002; Dantas *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2020).



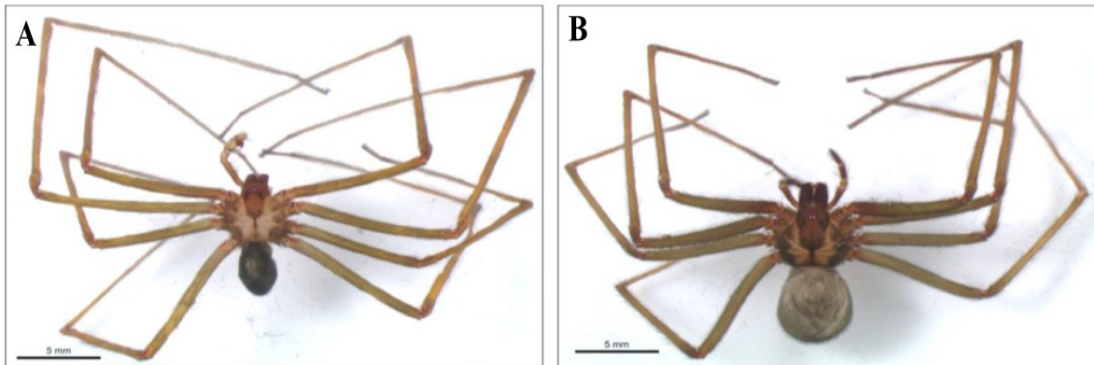
**Figura 5 - Resumo esquemático dos principais componentes tóxicos do veneno de *Loxosceles* e seus efeitos no loxoscelismo.** As Loxtox são os principais agentes necróticos, enquanto metaloproteases, hialuronidases, serinoproteases e peptídeos ICK atuam de forma complementar, promovendo inflamação, degradação tecidual, resposta imune e modulação da cicatrização. Existem outros componentes menos expressos que não são indicados no desenho esquemático.

## 1.2 Aspectos taxonômicos, biológicos e toxicológicos de *Loxosceles similis*

A espécie *L. similis* foi descrita pela primeira vez em 1898, no estado de São Paulo (Moenkhaus, 1898), sendo sua ocorrência mais frequentemente registrada nessa região, bem como nos estados do Pará, Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (Figura 1) (Trajano & Gnaspini-Netto, 1990; Ferreira *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2001). Essa espécie apresenta hábitos e habitats semelhantes aos relatados para *L. gaucho* e *L. variegata*, sendo comumente encontrada em ambientes domiciliares e construções, bem como em minas, cavernas e outros locais abrigados. Nosso grupo reportou a presença de *L. similis* no interior de residências em Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais, com aproximadamente 2,4 milhões de habitantes, reforçando a capacidade dessa espécie de adaptar-se a ambientes urbanos e sugerindo uma possível ocupação endêmica nessa área (Machado *et al.*, 2005).

Com base na morfologia, essa espécie pertence ao grupo Gaucho, juntamente com *L. gaucho*, *L. adelaida* e *L. variegata*. A identificação da espécie é realizada atualmente com base na chave taxonômica proposta que considera diversas características morfológicas, incluindo a estrutura do pedipalpo, um dos traços distintivos de *L. similis*, além da disposição dos três pares de olhos em formato de “U” característicos do gênero (Gertsch, 1967). A Figura 6 ilustra dois espécimes encontrados na Gruta da Lapinha, em Minas Gerais, que correspondem a um macho

(Figura 6A) e uma fêmea (Figura 6B), que geralmente possuem pernas proporcionalmente mais longas do que as observadas em outras espécies do mesmo gênero.



**Figura 6 - Exemplos macho e fêmea da espécie *L. similis*** - Os espécimes ilustrados correspondem a macho (A) e fêmea (B) e foram encontrados no interior da Gruta da Lapinha, em Minas Gerais.

Ensaio *in vitro* e *in vivo* com o veneno de *L. similis*, conduzidos em camundongos e coelhos e corroborados por análises microscópicas, confirmaram efeitos característicos do loxoscelismo, incluindo a ocorrência de dermonecrose, inflamação e hemólise, em consonância com as manifestações clínicas descritas para outras espécies do gênero *Loxosceles*. Essas evidências, detalhadas na Tabela 2, reforçam a inclusão do loxoscelismo causado por *L. similis* no mesmo quadro clínico já estabelecido para outras espécies do gênero.

**Tabela 2. Resumo cronológico dos achados experimentais relacionados à caracterização do veneno de *L. similis*.** A tabela apresenta os principais estudos que descrevem suas propriedades bioquímicas, toxicológicas e imunológicas, incluindo análises *in vitro* e *in vivo*, identificação de componentes do veneno e avaliação de suas atividades biológicas e potencial de neutralização.

Ano	Resultados	Referências
2005	O veneno de <i>L. similis</i> induz os efeitos dermonecróticos, hemolíticos e inflamatórios similares aos causados por <i>L. intermedia</i> . Além disso, a neutralização efetiva dos efeitos tóxicos por um antiveneno comercial reforça as similaridades bioquímicas e funcionais entre o veneno de <i>L. similis</i> e os venenos de <i>L. gaucho</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. intermedia</i>	(Silvestre <i>et al.</i> , 2005)
2011	O veneno de <i>L. similis</i> contém esfingomielinase D (SMAse D), capaz de hidrolisar a esfingomielinina e desempenhar um papel central nos efeitos tóxicos e pro-inflamatórios do veneno	(Gomes <i>et al.</i> , 2011)
2012	O veneno de <i>L. similis</i> , até mesmo em pequenas doses (0,5 µg), induz uma resposta inflamatória severa caracterizada por lesão vascular e marcada pela ativação imunológica local	(Pereira <i>et al.</i> , 2012)
2014	Apoptose, degranulação de mastócitos e degradação de colágeno desempenham papel central na patogênese da lesão cutânea induzida pelo veneno de <i>L. similis</i>	(Pereira <i>et al.</i> , 2014)
2014	O veneno de <i>L. similis</i> induz a ativação de caspases dependentes de apoptose	(Dantas <i>et al.</i> , 2014)
2016	A análise transcriptômica pelo método do NGS da glândula de veneno de <i>L. similis</i> revelou a presença de 23 sequências completas e 8 incompletas de enzimas Loxtox. As sequências encontradas foram classificadas em 12 grupos baseados em domínios conservados como o sítio catalítico e a região de ligação ao íon Mg <sup>2+</sup> . Além disso, foram identificadas três sequências PLD-like sem o domínio canônico que contém o sítio catalítico	(Dantas <i>et al.</i> , 2016)
2018	A inclusão de epítopos selecionados de células B a partir de toxinas de <i>L. similis</i> em uma proteína multiepitópica recombinante melhora significativamente a resposta imune, repercutindo em uma alta titulação de anticorpos que reconhecem efetivamente e neutralizam as principais atividades do veneno, como as relacionadas com a ação de esfingomielinases D, hialuronidases e metaloproteases	(Lima <i>et al.</i> , 2018)
2020	Duas isoformas recombinantes de Loxtox a partir do veneno de <i>L. similis</i> (recLoxtox s1A e recLoxtox s11A) foram caracterizadas funcionalmente. A isoforma recLoxtox s1A apresentou uma alta atividade sobre esfingomielinina D em pH 7,4 e induziu lesões dermonecróticas mais severas em pele de coelho, mimetizando de forma bem parecida a atividade do veneno total. Em contraste, a recLoxtox s11A apresentou sua atividade máxima em pH 8,0 e causou lesões menos severas. As duas isoformas foram capazes de induzir a produção de anticorpos específicos capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno de <i>L. similis</i> em ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , sendo que recLoxtox s1A revelou um maior potencial imunogênico e mais eficiência em neutralizar os efeitos tóxicos do veneno	(Leal <i>et al.</i> , 2020)
2024	O veneno de <i>L. similis</i> estimula a agregação plaquetária, induz a hemólise e promove a degradação de fibrinogênio.	(Magalhães <i>et al.</i> , 2024)

O primeiro estudo biológico sobre o veneno de *L. similis* foi conduzido por Silvestre e colaboradores em 2005. Nesse trabalho, os autores caracterizaram o veneno por meio de proteômica bidimensional e ensaios funcionais. O veneno mostrou-se predominantemente composto por proteínas com massas moleculares entre 28 e 112 kDa, apresentando um perfil semelhante ao de *L. intermedia*. Ensaio funcionais demonstraram que o veneno de *L. similis* induz lesões dermonecróticas significativas em coelhos, comparáveis às causadas por *L. intermedia*, além de apresentar atividade hemolítica dependente do complemento e alta letalidade em camundongos ( $DL_{50} = 0,32$  mg/kg). Análises imunológicas por Western Blot e ELISA revelaram forte reatividade cruzada entre o veneno de *L. similis* e os antissoros produzidos contra *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Além disso, o soro antiveneno polivalente produzido pelo CPPI mostrou-se eficaz na neutralização dos efeitos dermonecróticos do veneno de *L. similis*. Por fim, análises microbiológicas detectaram a presença da bactéria *Clostridium septicum* nas quelíceras de *L. similis*, sugerindo um possível papel de infecção secundária que pode piorar as lesões dermonecróticas (Silvestre *et al.*, 2005).

Nosso grupo demonstrou que o veneno de *L. similis* é capaz de induzir lesões cutâneas significativas em coelhos, incluindo inflamação, trombose e dermonecrose. A pré-incubação com soro antiveneno específico da espécie ( $\alpha$ -*L. similis* e  $\alpha$ -*L. intermedia*) neutralizou de forma eficiente esses efeitos e inibiu a atividade de esfingomielinase. O veneno de fêmeas causou lesões mais severas e respostas imunológicas mais intensas; entretanto, tanto os venenos de machos quanto de fêmeas foram bem reconhecidos pelos soros antiveneno de *L. similis* e *L. intermedia*, evidenciando a eficácia e a reatividade cruzada dos anticorpos (Chatzaki *et al.*, 2012). Por fim, um estudo publicado em 2014 investigou o efeito do veneno total de *L. similis* na indução de necrose e apoptose (Dantas *et al.*, 2014), elucidando o envolvimento das caspases no processo de morte celular. O veneno de *L. similis* desencadeia uma cascata de sinalização apoptótica que inclui a ativação da caspase-9 (iniciadora) e das caspases-3, -6 e -7 (efetoras) em fibroblastos humanos primários da pele.

A primeira descrição da família Loxtox no veneno de *L. similis* foi realizada pelo nosso grupo e apresentada no trabalho de Dantas (Dantas *et al.*, 2016), que utilizou a tecnologia de NGS para analisar o transcriptoma da glândula de veneno dessa espécie. O estudo elucidou 12 grupos pertencentes à família Loxtox, compostos por 23 sequências completas e 8 sequências proteicas incompletas (Tabela 3 e Anexo I). A numeração dos grupos (s1 a s12) reflete o agrupamento filogenético obtido a partir de uma árvore *neighbor-joining* com suporte *bootstrap*  $\geq 70$ , construída com base em um alinhamento múltiplo de sequências utilizando o algoritmo Clustal W. Além da análise filogenética, foram realizadas comparações com sequências de

fosfolipases-D (PLDs) previamente descritas e disponíveis nos bancos de dados GenBank e UniProt. As designações de subgrupos (A, B, C, D) indicam isoformas distintas dentro de um mesmo grupo filogenético, que compartilham alta similaridade entre suas sequências.

**Tabela 3. Agrupamento das toxinas da família Loxtox identificadas em *L. similis*.** As toxinas foram classificadas de acordo com os subgrupos filogenéticos e seus respectivos níveis de expressão no transcriptoma da glândula de veneno. A primeira coluna apresenta o nome do grupo de cada sequência de toxina; a segunda coluna indica as toxinas, com base em análises filogenéticas e de similaridade entre sequências; a terceira coluna mostra a porcentagem de expressão relativa de cada toxina, calculada a partir da contagem normalizada de transcritos (RPKM). Fonte: Dantas *et al.*, 2016.

Grupos	Toxinas	% Expresssão
<b>Loxtox s1</b>	s1A, s1B, s1C, s1D, s1E, s1F, s1G	53.9%
<b>Loxtox s2</b>	s2A, s2B, s2C	6.2%
<b>Loxtox s3</b>	s3A	8.6%
<b>Loxtox s4</b>	s4A	1%
<b>Loxtox s5</b>	s5A	0.01%
<b>Loxtox s6</b>	s6A, s6B	0.03%
<b>Loxtox s7</b>	s7A	0.12%
<b>Loxtox s8</b>	s8A, s8B, s8C	0.73%
<b>Loxtox s9</b>	s9A, s9B	8.3%
<b>Loxtox s10</b>	s10A, s10B, s10C	2.6%
<b>Loxtox s11</b>	s11A, s11B, s11C, s11D, s11F	18.5%
<b>Loxtox s12</b>	s12A	0.002%

Em relação a outras espécies, a família Loxtox já foi identificada em *L. reclusa*, *L. intermedia*, *L. gaucho*, entre outras, apresentando altos valores de similaridades entre as sequências, que variam entre 55% e 95% (Kalapothakis *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005; Felicori *et al.*, 2006; Dragulev *et al.*, 2007;). Embora mais de 200 sequências proteicas relacionadas à família Loxtox estejam disponíveis em bancos de dados públicos, apenas um número limitado delas foi investigado em detalhe quanto às diferenças em sua atividade biológica. A Tabela 4 apresenta a relação das toxinas Loxtox já caracterizadas em diferentes espécies de *Loxosceles* até o momento. Para a maioria das proteínas Loxtox descritas, a atividade catalítica sobre esfingomielina e a atividade dermonecrótica são conservadas. No entanto, também foram relatadas variantes com atividade dermonecrótica reduzida ou até ausente.

**Tabela 4. Proteínas recombinantes Loxtox e suas atividades biológicas.** Esta tabela resume as proteínas Loxtox recombinantes estudadas experimentalmente até o momento. A primeira coluna lista os nomes das proteínas juntamente com seus respectivos “Protein ID” entre parênteses, seguidos pela espécie de origem. A terceira coluna apresenta o percentual de identidade de aminoácidos com base no alinhamento de sequência com as proteínas Loxtox de *L. similis*. As colunas restantes descrevem as atividades biológicas demonstradas para cada proteína recombinante e citam as referências correspondentes.

Loxtox	Espécies	%ID <i>L. similis</i>	Atividades Biológicas	Referências
Smase D A1 (AEQ93955)	<i>L. adelaida</i>	89.35% Loxtox_s1E (ANY30964.1)	Atividade SMase D, Hemólise (dependente do complemento), atividade dermonecrótica, dissociação de colágeno, degeneração muscular, infiltração de neutrófilos.	(Tambourgi <i>et al.</i> , 2011)
Laz-Smase D (AAW22997)	<i>L. arizonica</i>	79.79% Loxtox_s1D (ANY30963.1)	Atividade SMAse D, toxicidade em grilos (PD <sub>50</sub> = 0,175µg)	(Zobel-Thropp <i>et al.</i> , 2012)
La_β1D1 (AJV88487)	<i>L. arizonica</i>	81.66% Loxtox_s10A (ANY30981.1)	Atividade SMAse D e LPC	(Lajoie <i>et al.</i> , 2015)
Lb1 (AAT66073)	<i>L. boneti</i>	82.97% Loxtox_s1D (ANY30963.1)	Atividade SMAse D, dermonecrótica e letalidade em camundongos (LD <sub>50</sub> = 5µg/camundongo)	(Olvera <i>et al.</i> , 2006; Ramos-Cerrillo <i>et al.</i> , 2004)
Lb2 (UniProt P0C2K0)	<i>L. boneti</i>	83.87% Loxtox_s1E (ANY30964.1)	Atividade SMAse D e dermonecrótica	(Ramos-Cerrillo <i>et al.</i> , 2004)
Lb3 (AAT66074)	<i>L. boneti</i>	89.05% Loxtox_s11D (ANY30987.1)	Sem atividade SMAse e dermonecrótica detectada	(Ramos-Cerrillo <i>et al.</i> , 2004)
LgRec1 DT1 / E32A-D34A (AFY98967)	<i>L. gaucho</i>	92.47% Loxtox_s1A (ANY30960.1)	Atividade SMAse D, hemólise (dependente do complemento), atividade dermonecrótica, edema, eritema, equimose, infiltrado de células inflamatórias, agregação plaquetária (plasma-dependente). Anticorpos α-LgRec1 foram capazes de neutralizar a dermonecrose induzida pelo veneno total de <i>L. gaucho</i> . A isoforma mutada é não-toxica, altamente imunogênica e capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes	(Magalhães <i>et al.</i> , 2013; Polli <i>et al.</i> , 2021, 2024; Shimokawa-Falcão <i>et al.</i> , 2017)
LgRec2 DT2 (AQY63355)	<i>L. gaucho</i>	80.36% Loxtox_s1C (ANY30962.1)	Atividade SMAse D, hemólise, dermonecrose, edema, eritema, equimose, infiltrado de células inflamatórias e agregação plaquetária (maior que LgRec1)	(Shimokawa-Falcão <i>et al.</i> , 2017)
LiRecDT1 / W230A (ABA62021)	<i>L. intermedia</i>	80.07% Loxtox_s1D (ANY30963.1)	Atividade SMAse D, atividade dermonecrótica, edema, exsudação de fibrina, infiltração de células inflamatórias, agregação plaquetária, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hemólise dependente e não-dependente do complemento. A forma mutante não apresenta toxicidade, é altamente imunogênica e capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes	(Bertoni da Silveira <i>et al.</i> , 2006; Chaim <i>et al.</i> , 2006; Chaves-Moreira <i>et al.</i> , 2011; de Oliveira <i>et al.</i> , 2008; Polli <i>et al.</i> , 2021, 2024)

LiRecDT2 (AAP97092/ ABB69098)	<i>L. intermedia</i>	80.07% Loxtox_s1D (ANY30963.1) / 83.16% Loxtox_s1D (ANY30963.1)	Atividade SMAse D, atividade dermonecrótica, edema, exsudação de fibrina, infiltração de células inflamatórias, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e hemólise dependente do complemento	(Bertoni da Silveira <i>et al.</i> , 2006; Tambourgi <i>et al.</i> , 2004)
LiRecDT5 (ABD91847)	<i>L. intermedia</i>	80.59% Loxtox_s10A (ANY30981.1)	Baixa atividade SMAse D, atividade dermonecrótica, hemólise dependente do complemento, infiltração de células inflamatórias, aumento da permeabilidade vascular. Não letal a camundongos. Não induz agregação plaquetária	(Bertoni da Silveira <i>et al.</i> , 2006; Chaves-Moreira <i>et al.</i> , 2011)
LiD1/Li rec/ recLiD/ LiDr (ABU43332)	<i>L. intermedia</i>	80.33% Loxtox_s1D (ANY30963.1)	Atividade SMAse D, atividade dermonecrótica, hemólise dependente do complemento, edema. Induz agregação plaquetária e a liberação das citocinas e quimiocinas IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2. Anticorpos $\alpha$ -rLiD1 foram capazes de neutralizar tanto a dermonecrose quanto a letalidade causada pelo veneno total de <i>L. intermedia</i>	(Araujo <i>et al.</i> , 2003; Felicori <i>et al.</i> , 2006, 2009; Gomes <i>et al.</i> , 2011; Horta <i>et al.</i> , 2013; E. Kalapothakis <i>et al.</i> , 2002)
P1 (AAP97091/ AAQ16123)	<i>L. intermedia</i>	80.39% Loxtox_s1D (ANY30963.1) 80.67% Loxtox_s1D (ANY30963.1)	Alta atividade SMAse D, atividade dermonecrótica, infiltração de células inflamatórias, dissociação de colágeno, hemólise dependente do complemento, expressão de MMP-9 e MMP-2 em fibroblastos de pele	(Tambourgi <i>et al.</i> , 2004, 2005)
LiRecDT4 (ABD91846)	<i>L. intermedia</i>	72.08% Loxtox_s2B (ANY30968.1)	Alta atividade SMase D, atividade dermonecrótica, infiltração de células inflamatórias, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária, hemólise não dependente do complemento, não letal em camundongo	(Bertoni da Silveira <i>et al.</i> , 2006; Chaves-Moreira <i>et al.</i> , 2011)
LiRecDT3 (ABB71184 / ABD48088/ ABU43334)	<i>L. intermedia</i>	86.51% Loxtox_s11D (ANY30987.1) / 86.51% Loxtox_s11D / 86.51% Loxtox_s11D	Baixa atividade SMase D, sem atividade dermonecrótica, eritema, edema, infiltração de células inflamatórias, hemólise não dependente do complemento	(Bertoni da Silveira <i>et al.</i> , 2006; Chaves-Moreira <i>et al.</i> , 2011)
LiRecDT6 (ABO87656)	<i>L. intermedia</i>	69.06% Loxtox_s4A (ANY30971.1)	Alta atividade SMase D, atividade dermonecrótica, edema, infiltração de células inflamatórias, dissociação de colágeno, aumento da permeabilidade celular, agregação plaquetária, letalidade em camundongos, hemólise não dependente do complemento	(Appel <i>et al.</i> , 2008; Chaves-Moreira <i>et al.</i> , 2011)
LiRecDT7 (AGN52903)	<i>L. intermedia</i>	79.48% Loxtox_s4A (ANY30971.1)	Atividade SMase D, atividade dermonecrótica, edema, hemorragia, trombose, infiltração de células inflamatórias, aumento da permeabilidade vascular, hemólise dependente do complemento	(Vuitika <i>et al.</i> , 2013)
SMaseI/ LI1 / H17/ LIPLD1 / LIRecDT1	<i>L. laeta</i>	67.09% Loxtox_s5A (ANY30972.1)	Alta atividade SMase D, atividade sobre Lisofosfatidilcolina (LPC) (ligada a albumina), atividade dermonecrótica, dissociação de	(Catalán <i>et al.</i> , 2011; de Santi Ferrara <i>et al.</i> , 2009; Fernandes Pedrosa <i>et al.</i> , 2002; M. T. Murakami <i>et</i>

H12A -H474 (AAM21154)			colágeno, edema, degeneração muscular, infiltração de células inflamatórias, hemólise dependente do complemento, letalidade em camundongos (LD50 = 11.3 µg/mouse), anticorpos α-SMase I capazes de neutralizar a dermonecrose e hemólise induzidas pelo veneno total de <i>L. laeta</i> . A forma mutante não é tóxica, é altamente imunogênica e capaz de induzir anticorpos neutralizantes	al., 2006; Olvera <i>et al.</i> , 2006; Polli <i>et al.</i> , 2021, 2024; Van Meeteren <i>et al.</i> , 2004)
SMase II / H10 (AAM21156)	<i>L. laeta</i>	82.24% Loxtox_s11B (ANY30985.1)	Baixa atividade SMase D, atividade dermonecrótica, dissociação de colágeno, edema, degeneração muscular, infiltração de células inflamatórias, hemólise dependente do complemento	(de Santi Ferrara <i>et al.</i> , 2009; Fernandes Pedrosa <i>et al.</i> , 2002)
L12 (ABD15448)	<i>L. laeta</i>	63.76% Loxtox_s5A (ANY30972.1)	Alta atividade SMase D, letalidade em camundongos (LD50 ¼ 2.37µg/camundongo)	(Olvera <i>et al.</i> , 2006)
LIPLD2 (ADP00409)	<i>L. laeta</i>	62.91% Loxtox_s5A (ANY30972.1)	Sem atividade SMse, sem atividade hemolítica, sem atividade dermonecrótica. Anticorpos α-rLIPLD2 capazes de neutralizar a dermonecrose e hemólise causada pelo veneno total de <i>L. laeta</i>	(Catalán <i>et al.</i> , 2011, 2014)
Smase I H13≈ Smase I (AAM21155)	<i>L. laeta</i>	65.38% Loxtox_s5A (ANY30972.1)	Atividade SMase D, ativação da via clássica e alternativa do complemento, atividade dermonecrótica, edema, eritema e leve sensibilidade	(Fernandes Pedrosa <i>et al.</i> , 2002)
Lr2 (AAT66076/ ANY30984)	<i>L. reclusa</i>	83.23% Loxtox_s1D (ANY30963.1)	Atividade sobre SMase D, LPI, PLG, LPS, LPC, LPE, LBPA, LPCh, cLPA, hemólise dependente do complemento, migração de células do melanoma humano (A2058) sinalizada por receptores de LPA	(Lee & Lynch, 2005; Ramos-Cerrillo <i>et al.</i> , 2004)
Lr1 (AAT66075)	<i>L. reclusa</i>	99.34% Loxtox_s11B (ANY30985.1)	Atividade SMAse D, letalidade em camundongo (LD50 ¼ 3.50µg/camundongo)	(Olvera <i>et al.</i> , 2006; Ramos-Cerrillo <i>et al.</i> , 2004; Silvestre <i>et al.</i> , 2005a)
Rec-Loxtox s1A	<i>L. similis</i>	100% Loxtox_s1A (ANY30960.1)  95.42% Loxtox_s1B (ANY30961.1)	Atividade SMAse D (maior em pH 7,4), atividade dermonecrótica e edema. Análises histológicas revelam necrose de folículo capilar, angiectasia (dilatação anormal dos vasos sanguíneos), hiperemia, dissociação de fibras musculares e infiltração de células inflamatórias (neutrófilos e alguns linfócitos). O soro imune produzido apresentou forte reação cruzada com o veneno total de <i>L. similis</i> . Os soros α-recLoxtox s1A and α-recLoxtox s1A/s11A neutralizaram significativamente as lesões necróticas, prevenindo a dissociação de fibras de colágeno, redução da necrose de fibras musculares e da infiltração de células inflamatórias	(Leal <i>et al.</i> , 2020)
Rec-Loxtox s11A	<i>L. similis</i>	100%	Atividade sobre SMase D (maior em pH 8,0), edema e eritema	(Leal <i>et al.</i> , 2020)

		Loxtox_s11A (ANY30984.1)  99,34% Loxtox_s11B (ANY30985.1)	leves, com decréscimo no tamanho da lesão com o tempo. Análises histológicas revelam necrose do folículo capilar, mas não hemorragia. Nenhuma necrose observada em fibras musculares. O soro imune apresentou forte reação cruzada com o veneno total de <i>L. similis</i> . O soro α-recLoxtox s11A foi capaz de neutralizar a resposta inflamatória (<recLoxtox s1A)	
--	--	--	--	--

### 1.3 As Loxtox e sua importância para o Loxoscelismo

Os efeitos letais do loxoscelismo devem-se principalmente à atividade das Loxtox, que possuem uma massa molecular variando entre 30 a 35 kDa. Essas proteínas foram identificadas primeiramente como toxinas dermonecróticas devido à sua habilidade de causar danos na pele (Barbaro *et al.*, 1996). Essa família de proteínas (Kalapothakis *et al.*, 2007) é expressa na glândula de veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* e apresenta um alto grau de conservação entre suas isoformas, principalmente nos motivos PCDC/S (resíduos 51–54) na alça catalítica B, S/GDGITN (resíduos 191–196) na alça F e D/ENPW (resíduos 272–275) no domínio C-terminal. As Loxtox também possuem resíduos conservados no sítio catalítico, como H<sup>12</sup>, E<sup>32</sup>, D<sup>34</sup>, H<sup>48</sup>, D<sup>92</sup> e K<sup>94</sup> (numeração referente à Loxtox LiD1 de *L. intermedia*). A proteína em sua forma madura possui cerca de 280 a 360 resíduos, contendo um peptídeo sinal seguido por um pró-peptídeo.

O termo Loxtox foi proposto pelo nosso grupo e deriva da combinação dos termos “*Loxosceles*” e “toxina”, de forma a se referir tanto à origem quanto a atividade biológica dessas moléculas (Kalapothakis *et al.*, 2007). Essas proteínas foram primeiramente descritas como esfingomielinases D (Kurpiewski *et al.*, 1981); posteriormente, muitos autores começaram a utilizar o termo “Smase D” como sinônimo para toxinas de ação dermonecrótica nos venenos de aranhas marrons. A partir do momento em que algumas destas enzimas se mostraram capazes de hidrolizar outros tipos de lipídeos além da esfingomielina, o termo “Smase D” não era mais suficiente para nomear essa família de forma correta (Merchant *et al.*, 1997), o que levou à utilização do termo “Fosfolipases D” (Van Meeteren *et al.*, 2004; Lee and Lynch, 2005; Chaim *et al.*, 2011). Entretanto, a atividades dessas proteínas em outros substratos ou ainda a elucidação de isoformas que não apresentam atividade dermonecrótica detectada (De Andrade *et al.*, 2005; Bertoni da Silveira *et al.*, 2006; S. A. Leal *et al.*, 2020), trouxeram a necessidade

de um termo mais abrangente para designar essa família de proteínas; para isso foi estabelecido então o termo “Loxtox” (Kalapothakis *et al.*, 2007). A introdução deste termo teve como objetivo agrupar de forma sistemática e funcional as várias isoformas dessa família de toxinas, já identificadas através de análises de sequências de cDNA e caracterizadas por pequenas variações em suas sequências e potencial atividade funcional. Portanto, “Loxtox” se tornou uma designação unificada para essa família, facilitando a classificação e estudos comparativos dessas toxinas dentro de diferentes espécies de *Loxosceles*.

O primeiro membro da família Loxtox foi clonado por nosso grupo em 2002 (LiD1), a partir de *L. intermedia* (Kalapothakis *et al.*, 2002), seguido pela identificação de clones de Loxtox de *L. laeta* ainda no mesmo ano (Fernandes Pedrosa *et al.*, 2002). Desde então, diversos estudos demonstraram que as Loxtox recombinantes provenientes de venenos de *Loxosceles* atuam por múltiplas vias e são capazes de induzir respostas inflamatórias, dermonecrose, hemólise e agregação plaquetária, os sintomas mais proeminentes associados ao loxoscelismo (Tambourgi *et al.*, 2004; de Santi Ferrara *et al.*, 2009; V. *et al.*, 2011; Catalán *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2020;). As Loxtox têm se destacado como alvos promissores para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas inovadoras, incluindo a criação de terapias antiveneno mais eficazes para acidentes causados por *Loxosceles* (E. Kalapothakis *et al.*, 2007; Dantas *et al.*, 2016; Fingerhann *et al.*, 2020). Notavelmente, esses estudos mostraram que as Loxtox recombinantes reproduzem de forma bastante fiel os principais efeitos farmacológicos e fisiológicos induzidos pelo veneno total, sustentando seu uso tanto em modelos experimentais quanto em estratégias terapêuticas para o loxoscelismo.

#### 1.4 Diversidade enzimática do veneno de *Loxosceles*: além das Loxtox

Outros componentes como hialuronidases, metaloproteases, serinoproteases, entre outros, também desempenham papéis importantes na toxicidade do envenenamento por *Loxosceles* (Figura 5), além de representarem potenciais alvos para o aprimoramento do diagnóstico, da especificidade do tratamento e para a bioprospecção de novos produtos de interesse biotecnológico.

As hialuronidases são enzimas capazes de degradar glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, aumentando, assim, a permeabilidade tecidual no local do envenenamento e promovendo a difusão passiva do veneno através da matriz extracelular. A presença de hialuronidases no veneno do gênero *Loxosceles* foi relatada pela primeira vez

em 1973 (Wright *et al.*, 1973). Nesse estudo, a presença da enzima no veneno de *L. reclusa* foi demonstrada por meio de um ensaio turbidimétrico, que avaliou a redução da turbidez de uma solução de ácido hialurônico após sua degradação enzimática. A atividade foi quantificada comparando-se a diminuição da absorvância a 600 nm ao longo do tempo, na presença do veneno. Posteriormente, isoformas de hialuronidase foram identificadas nos venenos de *L. rufescens*, *L. laeta* e *L. intermedia*, com massa molecular variando entre 41 e 43 kDa (Young & Pincus, 2001; Ferrer *et al.*, 2013). A expressão e caracterização funcional, com base em uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*, foram abordadas no trabalho de Ferrer e colaboradores, cujos resultados reforçam a importância dessa enzima na ocorrência e agravamento de eritema, equimose e lesões dermonecroticas (Ferrer *et al.*, 2013). Curiosamente, a potencialização da ação letal de venenos pela enzima hialuronidase também foi observada em outros animais peçonhentos, como demonstrado por Oliveira-Mendes e colaboradores no estudo com o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (de Oliveira-Mendes *et al.*, 2019).

A presença de metaloproteases (MPs) tipo astacina (20–30 kDa) nos venenos de *Loxosceles*, como as identificadas em *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. reclusa* (Da Silveira *et al.*, 2007; Trevisan-Silva *et al.*, 2010) também contribui para suas atividades biológicas e pode representar um grupo proteico de relevância significativa para o loxoscelismo. Essas proteases são dependentes de zinco e caracterizadas pela presença do sítio de ligação ao metal (HEXXHXXGXXH) e pelo resíduo de metionina presente em uma região denominada “*met-turn*” (SXXMY) (Stöcker *et al.*, 1995; Gomis-Rüth *et al.*, 2012). A primeira descrição de metaloprotease no veneno desse gênero ocorreu em *L. intermedia*, com a elucidação de duas moléculas com atividades fibrinolítica, fibrinogenolítica e gelatinolítica (Feitosa *et al.*, 1998). Silveira e colaboradores reforçaram essa atividade dependente de metaloproteases em extratos de glândulas de veneno de *L. intermedia* e *L. laeta* (Da Silveira *et al.*, 2002). A existência dessas proteases também foi apontada nos venenos de *L. gaucho* (Zanetti *et al.*, 2002) e *L. rufescens* (Young & Pincus, 2001), sendo que o último estudo demonstrou ainda a ocorrência de atividade caseinolítica. Metaloproteases de animais peçonhentos têm sido associadas a efeitos nocivos decorrentes de picadas ou mordidas, como hemorragia, necrose, citotoxicidade e edema; exemplos podem ser citados em serpentes (Fox & Bjarnason, 1995; Wu *et al.*, 2001) e aranhas (Da Silveira *et al.*, 2002; Feitosa *et al.*, 1998). A atividade dessas enzimas no veneno pode representar um mecanismo biológico de dano tecidual, além de contribuir para a difusão de outras toxinas nos tecidos das vítimas. Algumas proteases também podem estar relacionadas a modificações pós-traducionais que aumentam a

letalidade das toxinas, como a remoção do peptídeo sinal e de resíduos da região terminal das toxinas (Carmo *et al.*, 2014).

Outras proteases, como as pertencentes à família das serinoproteases (85–95 kDa), envolvidas na degradação da matriz extracelular ou em distúrbios de coagulação, também foram descritas como componentes do veneno de *Loxosceles* (Veiga *et al.*, 2000). Proteínas da família TCTP (*Translationally Controlled Tumor Proteins*) também foram detectadas no veneno deste gênero (Gremski *et al.*, 2010; Matsubara *et al.*, 2013); essas proteínas atuam como efetores na liberação de histamina, a qual desempenha um papel fundamental na regulação do sistema imune, podendo estar associadas ao eritema, à difusão do veneno, ao prurido, à dor e, mais raramente, a casos de hipersensibilidade (Sade *et al.*, 2012; Boia-Ferreira *et al.*, 2019). Outro componente do veneno de *Loxosceles* é um grupo de peptídeos pertencentes à família *Inhibitor Cystine Knot* (ICK), variando de 3 a 10 kDa (Matsubara *et al.*, 2013). Esses peptídeos, caracterizados por um motivo estrutural altamente estável composto por três pares de cisteínas que formam pontes dissulfeto entre C1–C4, C2–C5 e C3–C6, adquirindo uma conformação incomumente estável (Narasimhan *et al.*, 1994; Pallaghy *et al.*, 1994), estão principalmente envolvidos em efeitos neurotóxicos por modularem canais iônicos e são considerados candidatos promissores para aplicações farmacológicas e para o desenvolvimento de bioinseticidas.

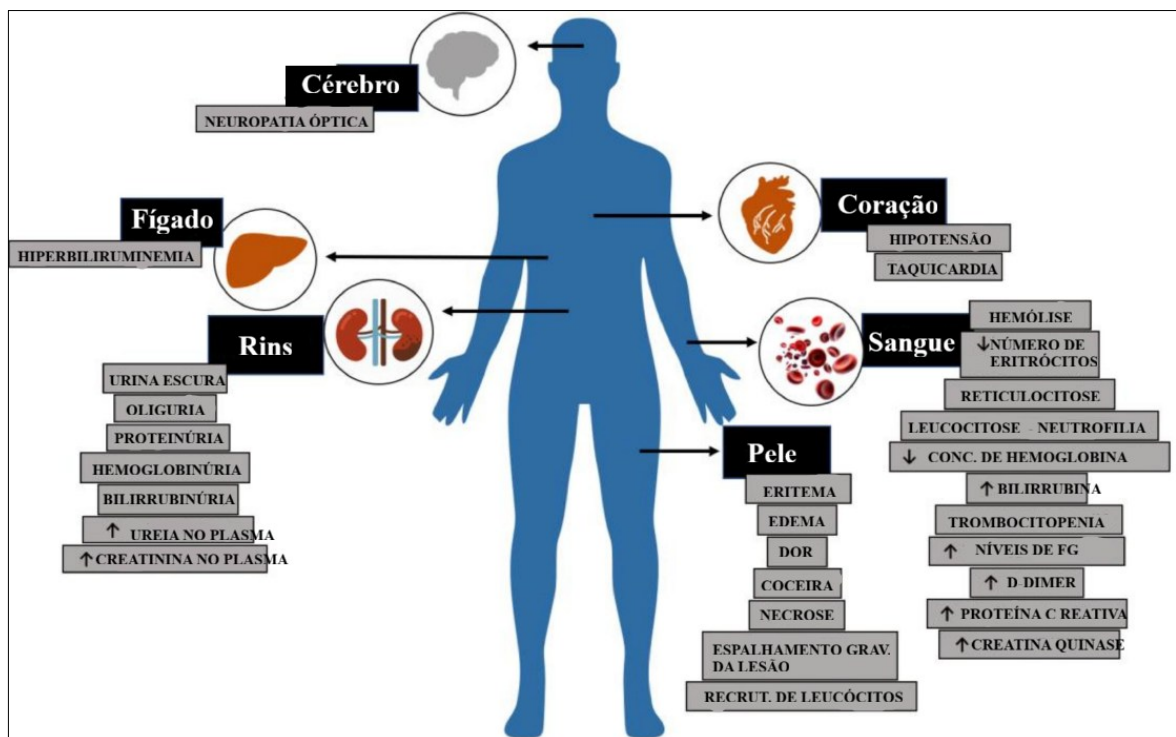
Por fim, enzimas como hidrolases, lipases, collagenases, fosfatases alcalinas, 5'-ribonucleotidases e fosfohidrolases também foram identificadas em níveis de expressão mais baixos em aranhas *Loxosceles* (da Silva *et al.*, 2004; Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008). Embora ainda não haja evidências de que essas famílias de proteínas exerçam efeitos tóxicos, sua presença no transcriptoma da glândula de veneno sugere que devem ser investigadas mais detalhadamente para elucidar seus possíveis papéis biológicos. A composição do veneno parece ser altamente conservada entre as espécies, ressaltando a importância evolutiva dessas moléculas.

### 1.5 *Loxoscelismo: Tendências e impactos dos acidentes*

O loxoscelismo é a condição clínica resultante do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*, que envolve sintomas locais característicos, principalmente devido à ocorrência de lesões dermonecroticas decorrentes da ruptura do tecido conjuntivo por componentes do veneno que afetam a homeostase, como já demonstrado para *L. similis* (Pereira *et al.* 2014; Leal *et al.*, 2020), apresentando padrão semelhante ao observado para outras espécies de interesse do

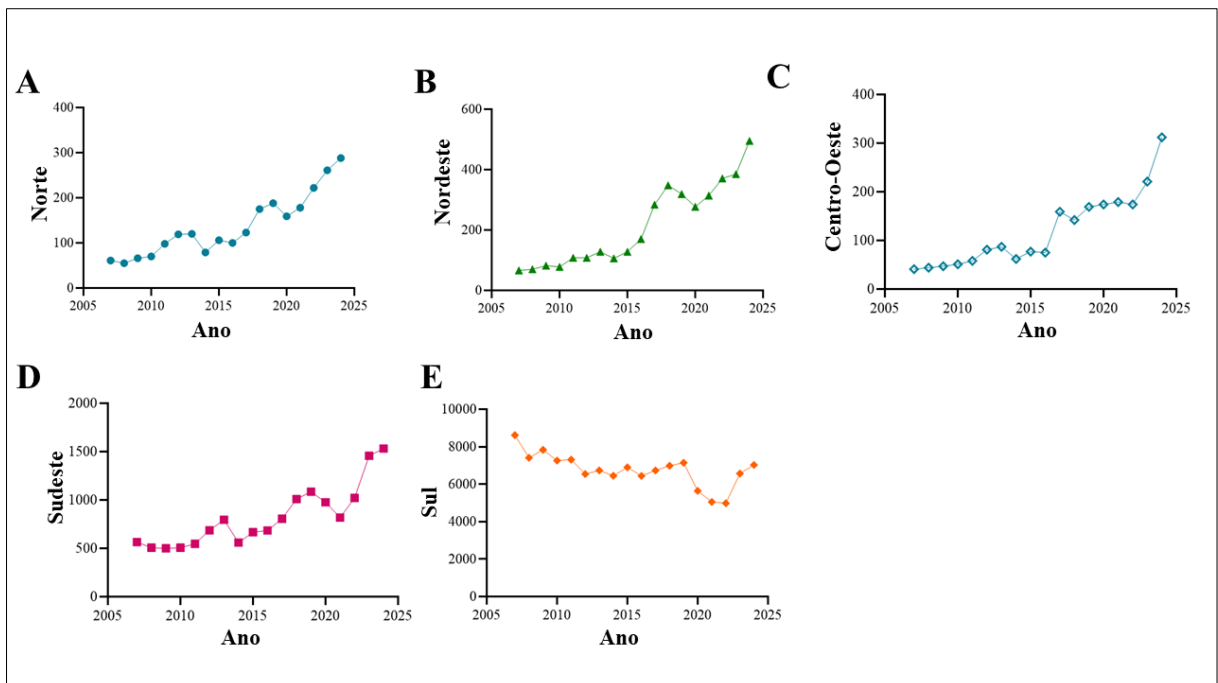
gênero (Mota *et al.*, 1995; Tambourgi *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2020). O primeiro sintoma após o acidente pode ocorrer entre 2 e 8 horas, manifestando-se com dor de intensidade variável, que posteriormente evolui para sensação de queimação local.

Em até 24 horas, com a região da picada já apresentando eritema e edema, podem surgir manifestações sistêmicas atribuídas ao loxoscelismo (Figura 7), sendo a insuficiência renal a complicação mais grave, geralmente associada à hemólise e suas consequências. Estima-se que cerca de 16% dos casos evoluam para complicações sistêmicas que podem, inclusive, levar ao óbito (Sezerino *et al.*, 1998; Málaque *et al.*, 2002; Schenone F, 2003; Ríos *et al.*, 2007). No entanto, uma análise conduzida pelo grupo de Tambourgi e publicada em 2020 relatou que 26% dos acidentes analisados resultaram em efeitos sistêmicos. Essas discrepâncias nas frequências reportadas podem estar relacionadas a um viés de publicação e notificação, no qual apenas os casos mais graves ou incomuns tendem a ser notificados e documentados na literatura (Lopes *et al.*, 2020).



**Figura 7 - Tecidos e órgãos afetados pelo loxoscelismo sistêmico e cutâneo.** Os principais sintomas são indicados na imagem. Setas para cima indicam valores aumentados. Setas para baixo indicam valores reduzidos. Adaptado de: (Gremski *et al.*, 2023).

No Brasil, o número de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* tem aumentado ao longo dos anos, embora ainda seja subestimado devido a falhas no sistema de notificação, bem como à falta de informação e conhecimento tanto da população quanto dos profissionais de saúde (Gremski *et al.*, 2014). Em 2024, foram registrados 9.567 acidentes atribuídos a esse gênero (Ministério da Saúde, 2025). Aproximadamente 73% dos casos ocorreram na Região Sul (7.030 registros), enquanto a Região Sudeste ocupou a segunda posição, com 15,9% das notificações, sendo observado um aumento de cerca de 173% no número de acidentes nos últimos dez anos, o que possivelmente indica o estabelecimento de uma situação epidêmica nessa região (Ministério da Saúde, 2025; Secretária de Vigilância em Saúde, 2022) (Figura 8).



**Figura 8 - Variação temporal do número de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* nas cinco regiões do Brasil.** (A) Norte, (B) Nordeste, (C) Centro-Oeste, (D) Sudeste e (E) Sul. Cada gráfico representa a tendência anual dos casos notificados em sua respectiva região, evidenciando diferenças regionais na ocorrência e distribuição dos acidentes no período de 2007 a 2024. Fonte dos dados: SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), Ministério da Saúde do Brasil.

A taxa de mortalidade, calculada a partir da relação entre o número de óbitos e o de notificações, aumentou de 0,08% em 2014 para 0,39% em 2024 (Tabela 5). Embora as Regiões Sul e Sudeste ainda concentrem a maior incidência de casos, outras regiões também vêm apresentando crescimento significativo no número de notificações de loxoscelismo. No Nordeste, por exemplo, foram registrados 106 acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* em 2014, número que aumentou para 495 em 2024 (Ministério da Saúde, 2025).

Dados recentes indicam que esses acidentes ocorrem tanto em áreas rurais quanto urbanas, sendo comum o atraso na busca por atendimento médico (Amorim *et al.*, 2024).

**Tabela 5. Notificações de acidentes por *Loxosceles* ocorridos no Brasil entre 2000 e 2024.** O número de notificações e óbitos é apresentado nas colunas centrais, enquanto a última coluna exibe a taxa de letalidade em percentual (TL%). O total de óbitos inclui tanto os casos classificados como decorrentes diretamente da condição notificada quanto aqueles atribuídos a complicações resultantes do acidente.

<i>Ano</i>	<i>Notificações</i>	<i>Óbitos</i>	<i>TL%</i>
2007	9356	14	0.15
2008	8088	6	0.07
2009	8533	6	0.07
2010	7971	9	0.11
2011	8121	7	0.08
2012	7542	3	0.04
2013	7870	9	0.11
2014	7263	6	0.08
2015	7885	8	0.10
2016	7474	7	0.09
2017	8112	11	0.13
2018	8665	11	0.12
2019	8906	12	0.13
2020	7236	10	0.14
2021	6541	12	0.18
2022	6778	10	0.14
2023	8895	15	0.17
2024	9657	38	0.39

O aumento no número de casos de loxoscelismo pode ser consequência de desequilíbrios ecológicos associados ao desmatamento, à redução de predadores naturais, às mudanças climáticas e a práticas de manejo de pragas agrícolas, que podem favorecer o deslocamento das aranhas para áreas urbanas. Nesse contexto, a degradação ambiental, aliada à elevada capacidade de adaptação das aranhas do gênero *Loxosceles* ao ambiente urbano, pode ser apontada como uma das principais causas do crescimento no número de acidentes (Singer *et al.*, 2011).

Partindo dessa perspectiva, Machado e colaboradores (2005) reforçaram a adaptação urbana das aranhas-marrons ao reportarem a ocorrência de três espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. similis*) na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Esses achados evidenciam não apenas o estabelecimento de espécies de importância médica em áreas densamente povoadas, mas também o risco potencial à população. A coexistência de múltiplas espécies de *Loxosceles* em uma mesma região sugere que o ambiente urbano oferece condições ecológicas favoráveis à sua sobrevivência e proliferação, contribuindo para o aumento da incidência de casos de loxoscelismo (Machado *et al.*, 2005).

Algumas estratégias vêm sendo propostas para o controle biológico de aranhas do gênero *Loxosceles*, especialmente em áreas urbanas. Entre elas destacam-se a utilização de predadores naturais, como determinadas espécies de vespas parasitas, pássaros insetívoros, lagartos e até fungos entomopatogênicos, como *Beauveria brongniartii* (G. Zimmermann, 2007). Medidas de manejo ambiental, como o plantio de vegetação que favoreça a presença desses predadores, também podem contribuir para o controle ecológico. O controle biológico representa uma alternativa sustentável ao uso de pesticidas químicos, promovendo um ambiente mais equilibrado e saudável. No entanto, deve ser planejado com cautela a fim de evitar a introdução de organismos que possam se tornar pragas secundárias e comprometer a eficácia e segurança da estratégia (Wise, 1993; Roy & Pell, 2000; P. Cardoso *et al.*, 2011).

#### *1.6 Diagnóstico e abordagens terapêuticas do loxoscelismo: avanços e perspectivas*

O acidente provocado por *Loxosceles* é caracterizado por uma picada indolor, cujos sinais clínicos e sintomas começam a se desenvolver apenas algumas horas após o incidente (em geral, entre 2 e 4 horas). Como a picada é praticamente imperceptível e a aranha raramente é capturada no momento do acidente, o diagnóstico e a identificação da espécie tornam-se um desafio. Atualmente, não há nenhum teste comercialmente disponível para a confirmação do loxoscelismo. Dessa forma, o diagnóstico é tipicamente presuntivo, baseado na análise dos dados clínicos e epidemiológicos coletados quando o paciente busca atendimento médico, geralmente entre 12 e 24 horas após o acidente, período no qual as lesões cutâneas tornam-se mais evidentes (Isbister *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2004; Hubbardet *et al.*, 2011). A condição do paciente costuma ser subestimada e pode ser confundida com infecções cutâneas de origem bacteriana ou viral (Vetter & Isbister, 2008) ou ainda úlceras diabéticas (Vetter & Isbister, 2008).

No Brasil, o tratamento para envenenamento por *Loxosceles* inclui a soroterapia com o soro Anti-Aracnídeo (SAAr IV), produzido pelo Instituto Butantan, que neutraliza os venenos do escorpião *Tityus serrulatus* e das aranhas *Phoneutria nigriventer* e *Loxosceles intermedia*. Outra alternativa é o soro Anti-Loxoscelico, produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), um antiveneno polivalente eficaz contra os venenos de *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia*. O antiveneno é administrado por via intravenosa, e o número de doses depende da gravidade da condição clínica do paciente. Segundo a OMS, a soroterapia é a única terapia com eficácia comprovada para o tratamento do envenenamento por *Loxosceles*.

Entretanto, em 2024, apenas 13,3% dos casos reportados receberam esse tipo de imunoterapia, cuja eficácia alcançou sucesso em 87% dos pacientes tratados (Ministério da Saúde, 2025). Como o antiveneno é mais eficaz quando administrado precocemente, atrasos no diagnóstico e início do tratamento reduzem significativamente sua efetividade. Além disso, estratégias alternativas vêm sendo utilizadas de forma complementar, incluindo administração de dapsona para modulação da resposta inflamatória, corticosteroides, analgésicos, anti-histamínicos, excisão cirúrgica, oxigenioterapia e vacuoterapia (VAC) (da Silva *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2004; Swanson and Vetter, 2005; Tutrone *et al.*, 2005; Abdulkader *et al.*, 2008; Vetter and Isbister, 2008; Tambourgi *et al.*, 2010; Andersen *et al.*, 2011; Hubbard and James, 2011).

Diferentes abordagens vêm sendo utilizadas para tratar o loxoscelismo ao redor do mundo. O desenvolvimento de novas terapias e novas possibilidades de diagnóstico vêm sendo abordadas em diferentes grupos de pesquisa. Chatzaki e colaboradores demonstraram que um anticorpo produzido contra o veneno de *L. similis* foi capaz de reduzir a ruptura do tecido conjuntivo e o edema na pele de coelhos, além de promover uma preservação parcial de colágeno e fibras reticulares (Chatzaki *et al.*, 2012). A expressão de proteínas recombinantes também pode auxiliar no desenvolvimento de tratamentos específicos; um trabalho publicado pelo nosso grupo caracterizou parcialmente duas isoformas de Loxtox do veneno de *L. similis* que podem ser utilizadas como ferramenta imunológica contra o loxoscelismo: recLoxtox s1A e recLoxtox s11A (Leal *et al.*, 2020). A complexidade da membrana basal e da matriz extracelular contando com diferentes tipos e/ou isoformas de colágenos, proteoglicanos, laminina, nidogenio/enantina e várias outras moléculas (Kalluri, 2003; Kim *et al.*, 2011; Yurchenco, 2011) sugere que muitos outros alvos para o tratamento específico de loxoscelismo podem ser identificados em futuros estudos.

A eficácia da administração tópica de tetraciclina em modelos *in vivo* de loxoscelismo foi avaliada através da investigação de potencial como ferramenta terapêutica para o tratamento de lesões dermonecroticas. Os resultados do estudo indicaram que a aplicação da tetraciclina cerca de seis horas após o envenenamento por *Loxosceles* reduz significativamente a formação de lesões dermonecroticas, associada à diminuição dos níveis de expressão da metaloprotease de matriz-2 (MMP-2) e à inibição da atividade de MMP-9, por meio da ação quelante sobre o íon  $Zn^{2+}$ . Dessa forma, ao inibir metaloproteases envolvidas na degradação da matriz extracelular, a tetraciclina desponta como uma opção promissora de potencial terapêutico para o loxoscelismo cutâneo (Paixão-Cavalcante *et al.*, 2007). O grupo de Okamoto avaliou o efeito da tetraciclina administrada por via intraperitoneal de camundongos no dano renal induzido pelo veneno de *L. intermedia* e por uma toxina isolada denominada P1 (AY304471.2). Os

resultados indicam que a ativação de MMP-2 e MMP-9 está envolvida no dano renal causado pelo envenenamento por *Loxosceles*, e que a administração de tetraciclina exerce efeito protetor contra esse dano. Esses achados tornam esse antibiótico uma opção promissora para o tratamento do loxoscelismo sistêmico (Okamoto *et al.*, 2017). Considerando ainda a possível ocorrência de infecções bacterianas secundárias associadas ao loxoscelismo (Monteiro *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2005) a tetraciclina pode contribuir para o tratamento dessas infecções, devido à sua ação antibiótica.

Uma outra abordagem terapêutica inovadora envolve o uso combinado dos antibióticos netilmicina (300 mg, via intramuscular, uma vez ao dia) e cefixima (400 mg, via oral, uma vez ao dia) por um período de 10 dias. A netilmicina é um antibiótico aminoglicosídeo efetivo principalmente contra bactérias Gram-negativas, enquanto a cefixima, uma cefalosporina de terceira geração, proporciona cobertura principalmente contra bactérias Gram-positivas. Pacientes submetidos a esse tratamento relatam significativa melhora na dor local e na inflamação após cinco dias. Essa estratégia tem se mostrado mais eficaz do que tratamentos convencionais, que geralmente utilizam apenas uma classe de antibióticos. A combinação de cefixima e netilmicina se apresenta, portanto, como uma ferramenta promissora para o tratamento das lesões necróticas decorrentes do loxoscelismo (Giorgio *et al.*, 2025).

Isoformas recombinantes mutadas de Loxtox, isoladas a partir de espécies de *Loxosceles* sul-americanas de relevância médica, têm sido investigadas como potenciais antígenos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o loxoscelismo. Um estudo publicado em 2021 descreveu o desenvolvimento de uma vacina protetora baseada em Loxtox recombinantes mutadas como antígenos no protocolo de imunização, a qual foi capaz de prevenir tanto os efeitos letais induzidos pelo veneno total de *L. intermedia* quanto o surgimento de lesões cutâneas decorrentes da ação dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. (Polli *et al.*, 2021). A imunização preveniu de forma eficaz a maioria dos edemas provocados pelos venenos totais, conferindo aproximadamente 90% de proteção em comparação ao grupo controle não vacinado. Em relação à dermonecrose, a resposta protetora foi observada frente aos três venenos avaliados 24 horas após a administração, alcançando taxas de proteção de 97% para *L. intermedia*, 97,3% para *L. laeta* e 95,8% para *L. gaucho*. Adicionalmente, a estratégia vacinal demonstrou eficácia contra a letalidade induzida pelo veneno de *L. intermedia*, reduzindo a mortalidade em cerca de 80% dos camundongos desafiados com o veneno total.

Para os ensaios que avaliaram o desenvolvimento de dermonecrose e edema, os animais foram desafiados 15 dias após a última etapa de imunização, a qual contou com duas doses de reforço (*booster*) administradas em um intervalo de 30 dias. Já os estudos de letalidade foram

conduzidos 10 dias após a última imunização. A produção e manutenção dos anticorpos neutralizantes foram monitoradas por um período de 90 dias após a imunização, evidenciando níveis sustentados durante todo esse intervalo. Descobertas recentes indicam que o número de doses de reforço possui impacto mais significativo na neutralização efetiva do que a dose do antígeno utilizada, promovendo redução expressiva da dermonecrose, edema, dano renal e letalidade. Esses resultados destacam o elevado potencial das isoformas recombinantes de Loxtox como antígenos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, capazes de combater tanto as manifestações cutâneas quanto sistêmicas associadas ao loxoscelismo (Polli *et al.*, 2024).

### 1.7 *Manifestações clínicas do loxoscelismo com ênfase em L. similis*

O envenenamento causado por aranhas do gênero *Loxosceles* pode manifestar-se sob formas cutânea, viscerocutânea ou sistêmica, variando em gravidade conforme a quantidade de veneno inoculada, resposta individual do paciente e tempo levado para procurar assistência médica e iniciar a soroterapia. As toxinas presentes no veneno desencadeiam processos inflamatórios, hemolíticos e necróticos que resultam em lesões locais e, em casos mais severos, comprometimentos sistêmicos como febre, hemólise e insuficiência renal aguda. Nesse contexto, a Tabela 6 sintetiza as principais manifestações clínicas relacionadas ao envenenamento por diferentes espécies de *Loxosceles*, complementando a ilustração da Figura 7.

**Tabela 6. Manifestações clínicas do loxoscelismo.** – Resumo das principais manifestações clínicas associadas ao envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*.

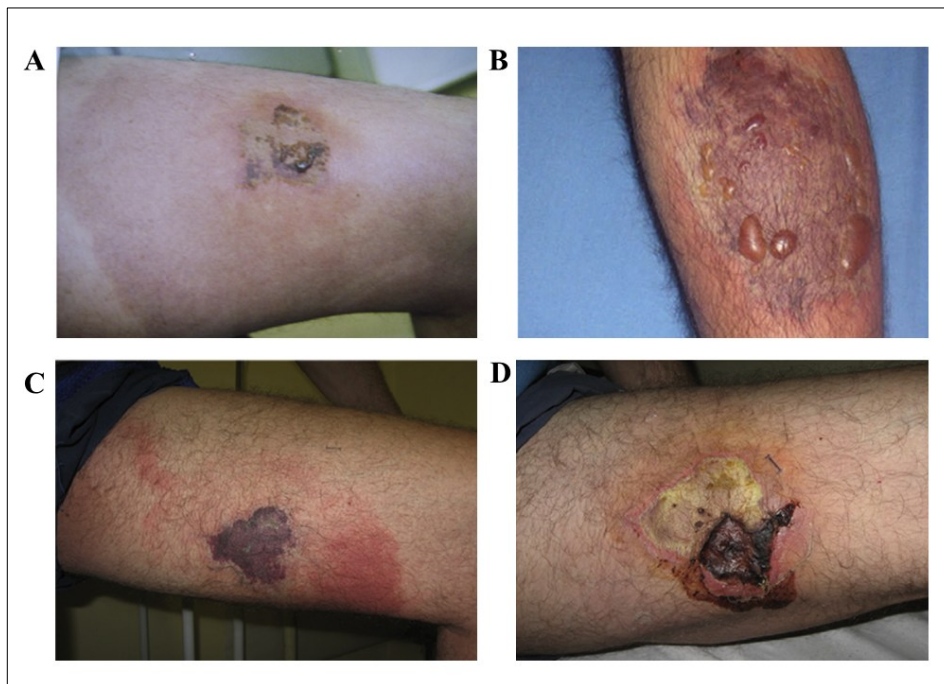
CATEGORIA	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	DESCRIÇÃO
<b>Cutânea</b>	Eritema, edema local, placa livedoide, bolha hemorrágica, úlcera necrótica	Lesão inicial dolorosa com eritema e descoloração violácea, evoluindo para formação de placa livedoide, bolha hemorrágica e ulceração necrótica em 24-72 horas
<b>Sistêmico leve</b>	Febre, mal-estar, mialgia, náusea, dor de cabeça, artralgia	Sintomas sistêmicos inespecíficos que podem acompanhar lesão cutânea.
<b>Hematológico</b>	Hemólise intravascular, anemia aguda, icterícia, hemoglobinúria, leucocitose	Desencadeada principalmente pelas Loxtox; pode resultar em anemia hemolítica.
<b>Renal</b>	Proteinúria, hemoglobinúria, Lesão Renal Aguda (LRA)	Obstrução dos túbulos renais, redução da filtração glomerular e insuficiência renal aguda
<b>Coagulopatias</b>	Coagulação Intravascular Disseminada (CID), trombocitopenia, alteração no tempo de coagulação	Manifestação secundária à ativação sistêmica da cascata de coagulação desencadeada por danos endoteliais e liberação exacerbada de mediadores inflamatórios, resultando em formação disseminada de micro-trombos, consumo plaquetário e disfunção hemostática que culminam em trombocitopenia e alterações nos tempos de coagulação
<b>Cardiovascular</b>	Hipotensão, taquicardia, choque circulatório	Observado em casos sistêmicos severos com síndrome da resposta inflamatória.
<b>Neurológico</b>	Irritabilidade, confusão mental (raro)	Raro e tipicamente associado com loxoscelismo sistêmico severo.

#### Fontes

NICHOLSON and NICHOLSON, 1962; Rees, O'Leary and King, 1983; Wasserman and Anderson, 1983; Williams *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2009; Dias-Lopes *et al.*, 2010; Chatzaki, C. C. Horta, *et al.*, 2012b; Del Brutto, 2013; Boia-Ferreira *et al.*, 2019; Gremski *et al.*, 2023; Rafaela Silva-Magalhães *et al.*, 2024.

A lesão cutânea característica do loxoscelismo inicia-se com uma resposta inflamatória aguda, evidenciada por edema localizado no sítio da picada, seguida por intensa infiltração de células inflamatórias, hemorragia dérmica e progressivo dano tecidual (Figura 9). Esse processo pode evoluir para uma intensa infiltração de neutrófilos, acompanhada de hiperemia, edema acentuado e hemorragia leve, como demonstrado no estudo de Núbia Pereira e colaboradores, que investigou os mecanismos inflamatórios e de dano tecidual induzidos pelo veneno de *L.*

*similis*. Os resultados evidenciaram que o veneno desencadeia apoptose significativa, degranulação de mastócitos e degradação de fibras de colágeno implantadas em esponjas, mimetizando as lesões dermonecroticas observadas em casos de envenenamento. Esses achados reforçam a natureza multifatorial da patogênese do loxoscelismo, destacando o papel do veneno de *L. similis* em induzir morte celular, liberação de mediadores inflamatórios e destruição da matriz extracelular, fatores que, em conjunto, contribuem para a severidade da lesão tecidual (Pereira *et al.*, 2014). Esses modelos de esponjas implantadas representam uma metodologia inovadora para o estudo do loxoscelismo, pois permitem mimetizar em camundongos os efeitos do veneno total e de toxinas isoladas, que, em condições normais, não induzem lesões cutâneas em resposta ao veneno de *Loxosceles*.



**Figura 9 - Loxoscelismo cutâneo** - (A) paciente picada na coxa. A lesão (2 dias após a picada) é caracterizada por edema e eritema, palidez, áreas hemorrágicas e formação de bolhas com conteúdo hemorrágico. (B) Paciente picada na panturrilha, dois dias após a picada. A lesão apresenta hematomas serosos que progrediram rapidamente para conteúdo hemorrágico e dor com a presença adicional de erupções cutâneas, mialgia e tontura. Vinte dias após a picada, o paciente apresentou descamação no local da ferida sem formação de úlcera. (C e D) paciente picado na parte interna da coxa. Quatro dias após a picada (C), danos locais presentes e caracterizados por edema, eritema, palidez e áreas hemorrágicas (placa marmórea). (D) mostra a área necrosada 20 dias após a picada. Este é um caso de suposto loxoscelismo, uma vez que a aranha não foi levada para identificação (Fonte: (Gremski *et al.*, 2014).

Um estudo conduzido pelo nosso grupo objetivou investigar os mecanismos de morte celular (apoptose e necrose) induzidos pelo veneno total de *L. similis* em fibroblastos dérmicos humanos primários. Os resultados demonstraram que o veneno é capaz de ativar uma via apoptótica intrínseca, que se inicia pela ação da caspase-9 que, subsequentemente, inicia uma

cascata de ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7. Uma redução significativa da viabilidade celular foi observada ( $EC_{50} \sim 40 \mu\text{g/mL}$ ), assim como sinais claros da ocorrência de apoptose. A utilização de inibidores específicos das caspases 6 e 7 bloquearam parcialmente a apoptose induzida pelo veneno, confirmando a função dessas enzimas no processo. Dessa forma, esse estudo foi capaz de promover uma forte evidência de que o veneno de *L. similis* é capaz de induzir a morte celular através de um mecanismo de apoptose dependente de caspase (Dantas *et al.*, 2014).

O loxoscelismo sistêmico é caracterizado pela ocorrência de hemólise intravascular, agregação plaquetária e lesão renal aguda (Okamoto *et al.*, 2024). A redução na produção de urina (oligúria) e o escurecimento da mesma, que podem ser uma evidência de hemólise intravascular extensiva, pode resultar em insuficiência renal, o que geralmente é a causa primária de morte associada ao loxoscelismo (Gremski *et al.*, 2014). A insuficiência renal pode ocorrer devido à hemólise intravascular causada pela ruptura dos glóbulos vermelhos pela ação das toxinas Loxtox; a hemoglobina liberada nesse processo é filtrada pelos glomérulos e pode precipitar nos túbulos renais, causando obstrução do fluxo urinário. Esse processo pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), o que causa dano oxidativo ao tecido renal e induz a necrose tubular aguda. A ocorrência da hemólise massiva combinada com a obstrução e dano oxidativo aos túbulos renais pode levar a uma filtração glomerular reduzida, resultando na insuficiência renal.

Evidências experimentais já demonstraram a ocorrência de necrose tubular aguda causada pela deposição de material eosinofílico nos túbulos proximal e distal (Petricevich, *et al.*, 1998; Luciano *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2017; Tambourgi); o aparecimento de edema e a presença de eritrócitos no espaço extracelular também já foram descritos (Luciano *et al.*, 2004). Por fim, um estudo recente conduzido por Okamoto e colaboradores demonstrou que o sistema do complemento pode contribuir para a patologia renal induzida pelo veneno de *Loxosceles*. Além disso, os autores sugerem que pacientes com loxoscelismo sistêmico poderão, no futuro, se beneficiar de abordagens terapêuticas baseadas no uso de inibidores de metaloproteases e de componentes do sistema do complemento. No entanto, essa possibilidade ainda requer validação em estudos pré-clínicos e clínicos adicionais. (Okamoto *et al.*, 2024).

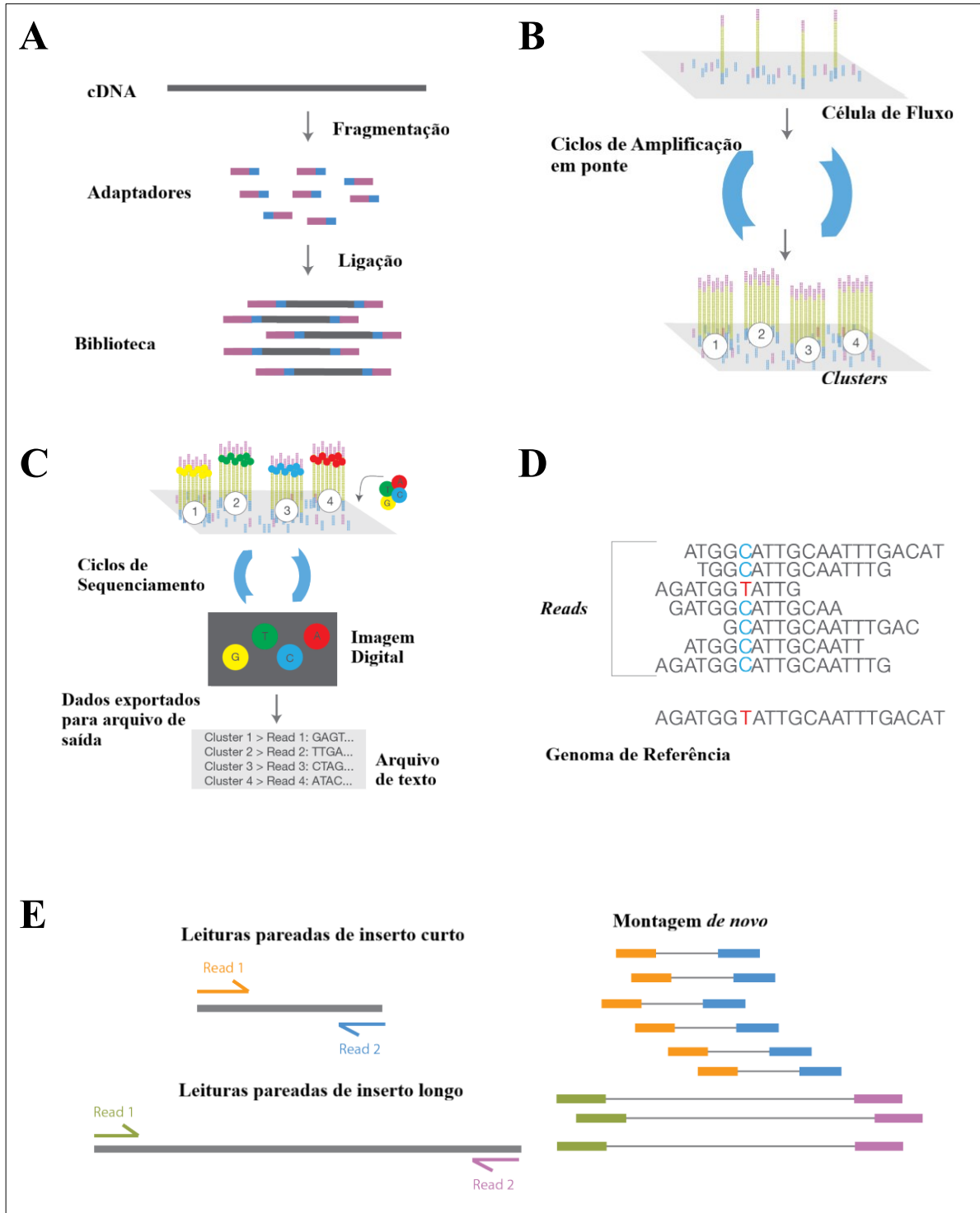
A lesão causada pelo envenenamento por *Loxosceles* pode resultar ainda em uma infecção secundária causada por espécies de bactérias anaeróbicas do Gênero *Clostridium*, como *C. perfringens* e *C. septicum*, que podem ser encontradas no veneno ou nas presas de aranhas *Loxosceles* (Silvestre *et al.*, 2005). Estudos já demonstraram que a *C. perfringens* é capaz de produzir cinco toxinas distintas: alfa (a mais tóxica e ativa entre elas, que desempenha

atividade necrótica, hemolítica e letal), beta, gama, delta e neuranimidase (Hatheway, 1990; Monteiro *et al.*, 2002). Essa bactéria apresenta ampla distribuição na natureza, sendo encontrada no solo, na água, em partículas suspensas no ar, em plantas e nas fezes de animais, e seus esporos podem permanecer viáveis por longos períodos (L., H.D *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 2000; Monteiro *et al.*, 2002).

### 1.8 O transcriptoma como ferramenta de estudo e o NGS

O transcriptoma corresponde ao conjunto completo de moléculas de RNA produzidas em uma célula em um determinado momento, refletindo seu estado de desenvolvimento e condição fisiológica específica (Z. Wang *et al.*, 2009). As principais metas dos estudos de transcriptoma envolvem o levantamento completo dos tipos de transcritos presentes, abrangendo mRNAs, RNAs não codificantes e pequenos RNAs. A partir dessa identificação, é possível definir a estrutura transcricional de cada gene, incluindo o local de início da transcrição, as extremidades 5' e 3', os padrões de *splicing* e outras modificações pós-transcricionais. Além disso, busca-se quantificar as variações nos níveis de expressão de cada transcrito em diferentes condições biológicas e estágios de desenvolvimento.

O sequenciamento do RNA (RNA-seq) foi introduzido em 2008 (Holt & Jones, 2008; Lister *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008; Nagalakshmi *et al.*, 2008) e tem se tornado cada vez mais utilizado devido principalmente à diminuição dos custos. O protocolo de RNA-seq inicia-se com a conversão do RNA em cDNA por meio da reação de transcrição reversa. Em seguida, as moléculas de cDNA são fragmentadas e recebem adaptadores que possibilitam sua posterior identificação (Figura 10A). A biblioteca é então carregada em uma célula de fluxo (Figura 10B), onde os fragmentos hibridizam à sua superfície e são amplificados por amplificação em ponte, formando *clusters*. Cada fragmento é sequenciado em uma plataforma de alto rendimento, gerando leituras curtas obtidas a partir de uma das extremidades (sequenciamento *single-end*) ou de ambas (sequenciamento *paired-end*) (Figura 10C). Durante o sequenciamento, nucleotídeos marcados com fluorescência são incorporados, e a célula de fluxo é fotografada para registro das emissões de cada cluster. A base inserida é identificada conforme o comprimento de onda e a intensidade da fluorescência. As leituras resultantes podem ser alinhadas a um genoma de referência (Figura 10D) ou, na ausência deste, reconstruídas por estratégias de montagem *de novo* (Figura 10E). O comprimento das *reads* geralmente varia entre 30 e 400 pares de bases, dependendo da tecnologia de sequenciamento empregada (Koch *et al.*, 2018; Z. Wang *et al.*, 2009).



**Figura 10 - Fluxograma do processo de construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento.** (A) Preparo da biblioteca de cDNA por fragmentação do DNA genômico e adição de adaptadores. (B) Amplificação dos *clusters* por hibridização e amplificação em ponte na célula de fluxo. (C) Sequenciamento com nucleotídeos fluorescentes e registro óptico das emissões. (D e E) Alinhamento e análise das leituras em relação a um genoma de referência ou por montagem *de novo*, respectivamente.

O estudo das glândulas de peçonha de *L. similis* por meio do NGS já foi anteriormente aplicado à investigação das Loxtox (Dantas *et al.*, 2016). Essa tecnologia possibilita uma análise abrangente do transcriptoma, acelerando a identificação de proteínas e peptídeos expressos nas glândulas de veneno. Embora o método de sequenciamento de Sanger também permita a descoberta de novos genes, sua eficiência na detecção de transcritos de baixa abundância é limitada (Quintero-Hernández *et al.*, 2011). Estratégias complementares de anotação funcionam como ferramentas adicionais para revelar esses transcritos menos expressos, ampliando a compreensão do conteúdo molecular do veneno (Yan Kalapothakis & Evanguedes Kalapothakis, 2021). Assim, este estudo apresenta uma análise do transcriptoma das glândulas de veneno de *L. similis* utilizando a abordagem NGS, com o objetivo de identificar proteínas potencialmente envolvidas nos efeitos tóxicos do veneno, além das Loxtox já descritas.

## **2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO**

O envenenamento causado por aranhas do gênero *Loxosceles* representa um relevante problema de saúde pública, devido à gravidade das manifestações clínicas associadas e à ampla distribuição dessas espécies no território brasileiro. Entretanto, aspectos relacionados à composição molecular e aos mecanismos de ação do veneno de *L. similis* permanecem pouco explorados, limitando o entendimento das bases biológicas do loxoscelismo.

A aplicação de tecnologias de NGS constitui uma abordagem robusta para a caracterização global do transcriptoma de tecidos especializados, como a glândula de veneno, possibilitando a identificação de genes expressos e de moléculas Loxtox destacam-se como os principais agentes responsáveis pelos efeitos dermonecróticos e inflamatórios, embora suas variações estruturais e funcionais ainda não estejam completamente esclarecidas.

Dessa forma, o presente estudo justifica-se pela necessidade de aprofundar o conhecimento sobre o perfil transcriptômico da glândula de veneno de *L. similis* e avaliar experimentalmente as atividades biológicas de proteínas recombinantes do grupo Loxtox, contribuindo para o avanço na compreensão dos mecanismos moleculares do loxoscelismo e para o desenvolvimento de futuras aplicações nas áreas de biotecnologia e saúde pública

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Realizar a caracterização transcriptômica da glândula de veneno de *Loxosceles similis* por meio de tecnologias de NGS e investigar as propriedades bioquímicas e biológicas de proteínas recombinantes do grupo Loxtox, visando ampliar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares associados à toxicidade e às respostas fisiopatológicas do loxoscelismo.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

- a) Caracterizar o transcriptoma da glândula de veneno de *L. similis*, identificando as principais famílias de toxinas envolvidas na composição do veneno;
- b) Classificar e analisar os grupos de proteínas putativas quanto a suas funções moleculares, com ênfase em enzimas relacionadas à toxicidade, como Loxtox, metaloproteases, hialuronidases e outros componentes auxiliares;
- c) Fazer a busca por sequências consenso utilizando o programa PHT-Kappa;
- d) Expressão e purificação de Loxtox recombinantes;
- e) Realizar análises biológicas integradas das toxinas recLoxtox s1A e recLoxtox s11A afim de compreender variações estruturais associadas às diferenças de atividade entre as isoformas, contribuindo assim para o entendimento dos mecanismos moleculares do envenenamento e de potenciais aplicações biotecnológicas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das aranhas e extração do RNA

Foram coletados 35 espécimes de *L. similis* na “Gruta da Lapinha”, uma gruta turística localizada no Parque Estadual do Sumidouro, em Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil (43°57'W, 19°33'S) (Dantas *et al.*, 2016). O local apresenta um número significativo de aranhas, que podem ser facilmente localizadas através do padrão característico de suas teias, que se assemelha a algodão. A coleta foi conduzida sob licença concedida pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF/MG; N° 047.2012).

A identificação das aranhas foi realizada principalmente pela análise de características morfológicas, sendo analisadas principalmente a presença de seis olhos agrupados em pares, corpo em formato de violino e as pernas longas e finas (Gertsch, 1967). A coloração observada é predominantemente marrom, sendo possível a observação de coloração mais escura e opaca nos espécimes antes da ecdise.

As glândulas de veneno foram removidas por meio de dissecação manual sob microscopia. Primeiramente, as aranhas foram imobilizadas e anestesiadas por exposição ao gelo, para então o cefalotórax ser cuidadosamente separado do abdome com o auxílio de pinças finas e micro tesouras. Uma vez expostas, as glândulas de veneno, que se apresentam como estruturas alongadas conectadas às quelíceras, foram removidas e transferidas para tubos de 1,5 mL no gelo. Foi feito um *pool* com as glândulas e o RNA total foi extraído com a utilização do reagente TRI (Sigma-Aldrich, MO, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA purificado foi quantificado através de leitura no fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies, MD, USA), e armazenado a -80°C até a utilização na construção da biblioteca de cDNA. A qualidade e integridade do RNA obtido foi avaliada por corrida de eletroforese em gel de agarose 1%.

### 4.2 Construção da biblioteca de cDNA e Sequenciamento de Nova Geração

A construção da biblioteca de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando o kit TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit, V2 (Illumina, CA, USA), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante para garantir a qualidade e a integridade da preparação da biblioteca. Após a preparação, a biblioteca foi quantificada utilizando o kit KAPA (Illumina®), que permite uma avaliação precisa da concentração e qualidade do DNA da biblioteca, assegurando sua adequação para o sequenciamento.

O sequenciamento de Nova Geração (NGS) foi conduzido em um sequenciador automático do tipo MiSeq (NextSeq 550 System - Illumina®), utilizando o kit MiSeq Reagent (ver. 3; 300 ciclos – 2 x 150) e adotando a estratégia de leitura *paired-end*, que proporciona uma maior precisão na montagem dos fragmentos. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as orientações do fabricante.

#### 4.3 Análise bioinformática de dados de RNA-Seq e montagem de contigs

Para assegurar a confiabilidade e a consistência dos dados utilizados nas análises, foi realizado um pré-processamento das leituras que envolveu as etapas de *trimming*, filtragem e montagem *de novo*, empregando o *software* Geneious Prime, versão 2022.1.1. As leituras brutas (*raw reads*) foram submetidas ao corte (*trimming*) e à filtragem de qualidade, aplicando-se o parâmetro  $Phred \geq 30$ , de modo a eliminar sequências de baixa qualidade. Os adaptadores Illumina® foram automaticamente removidos durante o processo. Após essas etapas, foram retidas aproximadamente 14,3 milhões de *reads* de alta qualidade.

A montagem *de novo* foi executada utilizando um valor de *k-mer* igual a 24 e um tamanho de bolha (*bubble size*) de 150, parâmetros que favorecem o agrupamento eficiente das sequências em *contigs* (Y. Kalapothakis *et al.*, 2021). Como resultado, foram obtidos 114.227 *contigs*, os quais foram empregados nas análises subsequentes.

Os *contigs* gerados no Geneious foram analisados quanto à similaridade com sequências depositadas em bancos de dados utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. As sequências identificadas foram agrupadas de acordo com os principais componentes do veneno, com base na comparação de suas sequências de aminoácidos. A sequência de aminoácidos foi obtida com o auxílio da ferramenta Expsy Translat (<https://web.expasy.org/translate/>) e PHTK.

#### 4.4 Anotação e buscas diretas por proteínas de interesse utilizando o software PHT-KAPPA (PHTK)

Foi conduzida uma busca direcionada por proteínas de interesse a partir de sequências consenso conhecidas, utilizando a ferramenta PHTK (<https://phtk-jpbahiazs-projects.vercel.app/>). Para essa análise, os *contigs* foram traduzidos nas seis *frames* de leitura e foram gerados arquivos no formato FASTA contendo as sequências de aminoácidos. No programa PHTK podemos buscar um padrão tanto em um arquivo de proteína (sequências de

aminoácidos) quanto em um arquivo de DNA (sequências de nucleotídeos). Ao colocar sequências consensos de domínios catalíticos, padrões de cisteínas ou outros trechos bem conservados entre os grupos, novos componentes que possuem esse padrão podem ser identificados independente da similaridade do restante da sua sequência primária com toxinas já descritas na literatura. Dessa forma, é possível fazer uma busca e análise manual dos *contigs* selecionados. As sequências identificadas foram submetidas ao BLASTP e posteriormente agrupadas conforme o respectivo grupo enzimático.

A busca é realizada com base na correspondência de aminoácidos idênticos entre as sequências, considerando o número de resíduos que variam entre elas. A Tabela 7 apresenta os principais grupos investigados e exemplos das respectivas sequências consenso utilizadas em cada busca. Além das sequências padrão características de cada grupo, previamente descritas na literatura, também foram incluídas sequências identificadas a partir dos alinhamentos realizados no software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) empregando o algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1997).

**Tabela 7. Exemplos de padrões utilizados no PHT-KAPPA.** A primeira coluna indica o grupo de toxina analisado, a segunda apresenta o padrão de sequência empregado na busca pelo programa PHTK e a terceira mostra a sequência efetivamente utilizada pelo algoritmo para a detecção dos elementos correspondentes.

Grupo de Toxinas	Padrão	Sequência que será procurada
<b>Loxtox</b>	M1L17G	MxLxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxG
	PCDC	PCDC
<b>Metaloproteases</b>	HE2H2G2H	HExxHxxGxxH
	S1M1Y	SxMxY
<b>PLA<sub>2</sub></b>	IFPGTKWCG	IFPGTKWCG
	DLG3DTDxCCRAHDxC	DLGxxxDTDxCCRAHDxC
	LTN1SPFT1LSCKCD1DFY1C	LTNxSPFTxLSCKCDxDFYxC
	C20CC	CxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxCC
	C24C2C	CxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxCxxC
<b>Toxinas Inseticidas</b>	ETHR1L	ETHRxL
	CRC3C	CRCxxxC
<b>Hialuronidase</b>	IIDWEAW	IIDWEAW

As figuras de alinhamento foram geradas no Geneious Prime 2022.2, considerando um alinhamento global com matriz de custo BLOSUM62 que consiste em comparar sequências ao longo de toda a sua extensão, buscando o melhor pareamento possível entre todos os seus resíduos. A matriz BLOSUM62 atribui pontuações para substituições de aminoácidos com base em sua similaridade com valores positivos para substituições conservadas e negativos para trocas menos prováveis. No Geneious, esse método permite avaliar o grau de identidade e similaridade entre proteínas homologas, destacando regiões conservadas e divergentes.

#### 4.5 Construção da Árvore Filogenética

A análise filogenética foi conduzida utilizando o software MEGA versão 12 (Kumar S., et al 2016), a partir de sequências de aminoácidos representativas de espécies do gênero *Loxosceles*. Inicialmente, as sequências foram alinhadas e a árvore filogenética foi reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*), empregando o modelo de substituição de aminoácidos Jones–Taylor–Thornton (JTT). A confiabilidade dos agrupamentos foi avaliada por meio de análise de *bootstrap* com 1000 réplicas, sendo colapsados os ramos correspondentes a partições reproduzidas em menos de 50% das réplicas. Os valores de *bootstrap*, expressos como a porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam, foram indicados ao lado dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram geradas automaticamente pelos algoritmos *Neighbor-Joining* (NJ) e BioNJ, com base em uma matriz de distâncias pareadas estimadas segundo o modelo JTT, sendo posteriormente selecionada a topologia com maior valor de log-verossimilhança.

#### 4.6 Expressão e Purificação das *Loxtox s1A* e *s11A*

Os clones utilizados na etapa de expressão foram desenvolvidos para um trabalho já publicado pelo nosso grupo (Leal *et al.*, 2020). Toxinas recombinantes foram projetadas a partir das sequências nucleotídicas que codificam para as regiões maduras das proteínas *Loxtox s1A* (GenBank: KU891936) e *Loxtox s11A* (GenBank: KU891960) descritas anteriormente (Dantas *et al.*, 2016). A sequência madura *Loxtox s1A* recombinante (*recLoxtox s1A*) e *s11A* (*recLoxtox s11A*) recombinantes foram otimizadas e sintetizadas pela GenScript Company e clonada no vetor de expressão pET11-a com uma sequência N-terminal adicional contendo 8 resíduos de histidina.

As construções *recLoxtox s1A* e *recLoxtox s11A* foram eletrotransformadas nas cepas *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* Origami 2 (DE3), respectivamente. Uma colônia de cada linhagem foi cultivada em 10 mL de caldo LB com 50 µg/mL de canamicina a 37 °C e 200 rpm por 24 h, e posteriormente transferida para 1 L do mesmo meio. As culturas foram incubadas sob as mesmas condições até alcançar OD600 de 0,6, quando a expressão protéica foi induzida com 0,06 mM de IPTG por 4 h.

As células de *E. coli* foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4 °C e ressuspendidas em tampão de lise (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M). A lise celular foi realizada

por sonicação para liberar as toxinas recombinantes. Após a lise, recLoxtox s1A e recLoxtox s11A foram recuperadas nas frações solúvel e insolúvel, respectivamente. A fração insolúvel da recLoxtox s11A foi separada por centrifugação (3000 g, 10 min, 4 °C) e solubilizada durante a noite em tampão de ligação contendo 6 M de uréia.

A purificação das proteínas recLoxtox s1A e recLoxtox s11A foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HP HisTrap™ 5 mL (GE Healthcare Lifesciences), conforme protocolo do fabricante. A coluna foi equilibrada e a ligação da amostra conduzida em tampão contendo Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 0,5 M e imidazol 40 mM. A eluição foi realizada com tampão semelhante, porém com imidazol na concentração de 0,5 M. Para remoção de sais da recLoxtox s1A, foi realizada dialise em tampão de Tris 50 mM (pH 7,5) e NaCl 0,1 M, com três trocas de tampão sob agitação e refrigeração. No caso da recLoxtox s11A, a uréia 6 M foi gradativamente eliminada por redução progressiva da concentração durante as trocas de tampão no processo de diálise (Tris 50 mM (pH 7,5) e NaCl 0,1 M contendo 4M, 2M, 1M e 0M de ureia).

#### 4.7 *Dosagem de proteínas*

A concentração proteica das amostras foi determinada empregando o método do ácido bicinconínico (BCA), conforme descrito (Smith *et al.*, 1985), utilizando o kit Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (SIGMA-ALDRICH) e seguindo as instruções do fabricante. A curva padrão foi construída com soluções de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 200 a 1000 µg/mL. O ensaio baseia-se na redução do íon cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pelas proteínas em meio alcalino, com posterior formação de um complexo corado entre o  $\text{Cu}^{2+}$  e o BCA, cuja intensidade e absorbância a 562 nm aumentam proporcionalmente à concentração de proteína presente na amostra. O produto final apresenta coloração roxa estável, permitindo quantificação precisa por espectrofotometria.

#### 4.8 *Eletroforese por SDS-PAGE*

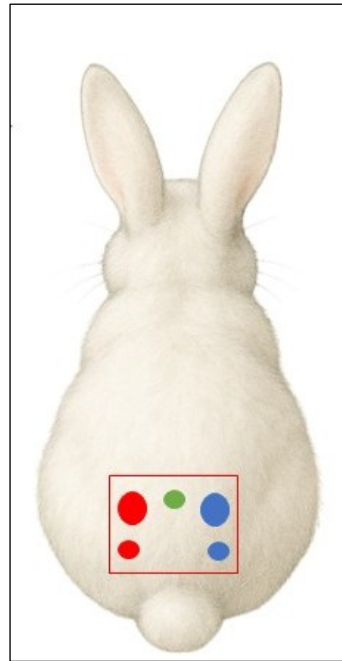
As toxinas recombinantes foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme o descrito (Laemmli, 1970). Aproximadamente 10 µg de proteína, previamente solubilizada em tampão redutor (Tris-HCl 0,5 M, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,01%, β-mercaptoetanol 10%), foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% (espessura de 1 mm). O gel de separação (12%) foi

preparado com acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8%, SDS 10%, persulfato de amônio (PSA) 10%, TEMED (1:2000) e Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. O gel de concentração (4%) consiste em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema Bio-Rad a 150 V. Após a eletroforese, os géis foram fixados em solução de ácido acético 10%, álcool etílico 25%, corados por 30 minutos com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% em metanol 45% e ácido acético 9%, e posteriormente descorados solução de etanol 4,5%, ácido acético 9% para a visualização das bandas.

#### 4.9 *Efeitos cutâneos das toxinas recombinantes em coelho*

Um coelho da raça Netherland Dwarf (6 semanas, 0,432 kg) foi submetido à tricotomia na região próxima à cauda, realizada inicialmente com tesoura para aparar os pelos, seguida da aplicação de creme depilatório Veet® para peles delicadas, que inclui uma lâmina plástica para remoção dos pelos. Esse método foi substituído o uso de lâminas de corte para evitar lesões na pele, que é fina e ressecada.

O animal foi então utilizado em um teste *in vivo* para avaliar e comparar a atividade dermonecrótica das toxinas recombinantes. Injeções intradérmicas de 2,5 µg e 5,0 µg de cada toxina foram aplicadas, além de uma dose de solução salina como controle negativo, totalizando 100 µL por ponto, com o volume das toxinas completado com salina. A Figura 11 ilustra os pontos de aplicação das doses.



**Figura 11 – Representação esquemática dos pontos de aplicação das toxinas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A.** Os círculos vermelhos indicam as regiões de aplicação de recLoxtox s1A, os círculos azuis correspondem às aplicações de recLoxtox s11A e o círculo verde representa o ponto de aplicação da solução salina (controle). Círculos maiores correspondem à dose de 5,0 µg, enquanto os menores indicam a dose de 2,5 µg. CEUA UFMG, licença de ética animal número 257/2017.

#### 4.10 *Ensaio de toxicidade de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em insetos (larvas de Tenebrio molitor)*

Larvas gigantes de *Tenebrio molitor* foram utilizadas para avaliar a toxicidade e letalidade das toxinas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A para que fosse estabelecido um modelo de toxicidade para Loxtox em inseto. As larvas foram adquiridas via loja Darly I T Stip (CNPJ 37.407.424/0001-85, NF-e nº 000.012.111) e mantidas em terrário com alimentação *ad libitum* à base de ração comercial.

Para os experimentos, foram utilizadas larvas no 10º e 12º estágios, sem lesões corporais evidentes e sem sinal de melanização (de Souza *et al.*, 2015). As injeções foram feitas entre o segundo e terceiro esternitos visíveis acima das pernas da larva (Lozoya-Pérez *et al.*, 2021), de forma a evitar que órgãos fossem atingidos durante o processo. Após a inoculação, os animais foram mantidos a 37 °C em frascos PET identificados, com a tampa furada e algodão úmido para evitar a desidratação. Os animais mortos foram definidos como aqueles de corpo rígido (irritabilidade ausente) e melanização corporal extensa.

O volume de injeção previamente estabelecido foi 15 µL, compatível com aplicação segura utilizando seringa de insulina (agulha 30 G). Testes prévios com solução salina foram

realizados em grupos de 5 larvas para confirmar que o veículo e o volume não ocasionavam mortalidade.

Grupos contendo três larvas foram expostos a doses progressivas nas concentrações de 3 ng/mL, 6 ng/mL, 12 ng/mL e 24 ng/mL de cada toxina, administradas em volume total de 15 µL por amostra diluída em salina. Em etapas subsequentes, foram testadas doses maiores nas concentrações de 1,3 µg/mL, 3,3 µg/mL e 6,6 µg/mL em grupos de 10 larvas. Como controles, foram utilizados solução salina, como negativo, e veneno total de *L. intermedia* (50 µg), como positivo. As soluções de recLoxtox s1A, recLoxtox s11A e veneno total foram preparadas em solução salina estéril no dia do experimento e mantidas em gelo até a inoculação.

Os animais foram observados imediatamente após a inoculação e monitorados duas vezes ao dia (manhã e tarde) durante 7 dias. Foram registrados: tempo para aparecimento de sinais clínicos (letargia, prostração), presença de melanização, redução da mobilidade e mortalidade. A definição de óbito seguiu critérios padronizados: rigidez corporal (ausência de resposta a estímulos táteis) e melanização extensa. A eutanásia das larvas foi realizada através de resfriamento e congelamento a -20°C.

#### *4.11 Atividade enzimática de recLoxtox s1A sobre a membrana corioalantoica (CAM) de ovos de galinha*

Considerando o caráter altamente vascularizado da membrana corioalantoide (CAM) do ovo de galinha, foi realizado um ensaio piloto para avaliar a ação da recLoxtox s1A neste sistema baseando-se em protocolo previamente estabelecido (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014). Um ovo fértil foi incubado em estufa a 37 °C e umidade em torno de 65% por 10 dias, tempo em que a CAM se apresenta desenvolvida e acessível. Antes da manipulação, a superfície da casca foi desinfetada com álcool 70%. No terceiro dia após a fertilização foi feita uma janela de cerca de 3mm na superfície da casca em área avascular, para que a pressão interna do ovo fosse alterada, prevenindo assim a adesão da CAM à casca. O orifício formado foi tampado com plástico filme durante todo o experimento, com o intuito de se evitar desidratação e possíveis infecções. No dia 10 após a fertilização, utilizando uma lâmina estéril, a janela criada na casca do ovo foi aumentada para cerca de 3 cm<sup>2</sup>.

A aplicação da toxina foi realizada utilizando seringa de insulina estéril, pela injeção de 20 µg de recLoxtox s1A em um volume total de 20 µl diretamente sobre a superfície da CAM, evitando grandes vasos. Imediatamente após a aplicação, a janela foi vedada com filme plástico,

e o ovo foi realocado na estufa para monitoramento e posteriores análises dos efeitos provenientes da ação da recLoxtox s1A.

#### 4.12 Ensaio de agregação plaquetária

##### 4.12.1 Plaquetas Lavadas (PL)

A fim de avaliar o efeito da recLoxtox s1A e recLoxtox s11A sobre a função plaquetária, foram realizados ensaios de agregação utilizando sangue humano, de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias (CEP, número CAAE: 89112225.2.0000.9507, parecer 7.626.236), uma vez que o ensaio foi realizado na FUNED no Laboratório SBVA (Serviço de Bioquímica de Venenos Animais). Amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis, não medicados há pelo menos 10 dias, em tubos BD Vacutainer® contendo solução ácido-citrato-dextrose (ACD). O sangue foi centrifugado a 1300 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos a 37 °C para obtenção do plasma. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos voluntários encontra-se no Anexo II.

As plaquetas foram lavadas segundo metodologia adaptada da literatura (Oliveira *et al.*, 2019; Sanchez *et al.*, 2016). O plasma foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, centrifugado novamente (1300 rpm, 10 min), e os pellets foram ressuspensidos em tubos de 2 mL contendo PGE1 0,5µM (1,4 µL. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 90 segundos a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet dissolvido em tampão Tyrode pH 6,2, (NaCl 137 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM, NaHCO<sub>3</sub> 3 mM, KCl 2,7 mM, Hepes 10 mM, glicose 5,6 mM,) pré-aquecido. Adicionou-se 1,2 µL de PGE1, e a etapa de centrifugação foi repetida duas vezes (na segunda, 0,8 µL de PGE1 em 2 mL de plaquetas). Finalmente, os pellets foram dissolvidos em 750 µL de Tyrode pH 7,4 e reunidos em tubo Falcon de 50 mL.

A contagem de plaquetas foi realizada no equipamento *Fully-Auto - Hematology Analyzer* (Mindray). A suspensão de plaquetas foi ajustada para  $2,5 \times 10^5$  plaquetas/µL no tampão Tyrode pH 7,4 e ativada por adição de CaCl<sub>2</sub> 2 mM e MgCl<sub>2</sub> 1 mM.

O agregômetro utilizado (AggRam Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA) é composto de 8 canais, e um deles era reservado para o controle somente com plaquetas (“espontânea” = ESP) e outro para o controle das plaquetas na presença do agonista, sem as enzimas. Todo o experimento é conduzido a uma temperatura de cerca de 37°C, o tempo de incubação dos agonistas com as plaquetas é de 3 minutos e após a aplicação da enzima o monitoramento da curva de agregação é feito por 10 minutos.

#### 4.12.2 Plasma rico em plaquetas (PRP)

Amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis, não medicados há pelo menos 10 dias, em tubos BD Vacutainer® contendo solução ácido-citrato-dextrose (ACD). O sangue foi centrifugado a 800 rpm para que fosse separado o PRP com auxílio de uma pipeta *pasteur* em tubos Falcon de 15 mL. Os tubos dos quais o PRP foi separado foram submetidos a uma segunda centrifugação (15 minutos a 3200 rpm) para obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) que seria utilizado como branco no aparelho. O restante do experimento foi conduzido no agregômetro conforme detalhado no item anterior.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Construção da Biblioteca de cDNA e Sequenciamento NGS

O NGS resultou em um total de 7.188.319 *clusters*, correspondendo a 14.376.638 leituras brutas (*raw reads*) obtidas a partir da biblioteca de cDNA construída com 1 µg de RNA total. Após a geração dos dados, as leituras passaram por um processo de trimagem e filtragem de qualidade, etapas essenciais para remover sequências com baixa qualidade de base, adaptadores residuais e fragmentos curtos, garantindo que apenas leituras de alta qualidade (13.994.548) fossem utilizadas nas análises subsequentes.

A montagem *de novo* foi conduzida no Geneious Prime (versão 2022.1.1), uma vez que o genoma de *L. similis* ainda não está disponível em bancos de dados públicos, o que inviabiliza o alinhamento baseado em genoma de referência. Essa abordagem permitiu a reconstrução de transcritos a partir das leituras limpas, resultando em 114.227 *contigs*. Para assegurar a confiabilidade das sequências montadas, foram selecionados 40.567 *contigs* com cobertura mínima de 50%, eliminando fragmentos redundantes e transcritos parcialmente montados. Esse conjunto final representa os transcritos de maior qualidade e representatividade do transcriptoma das glândulas de veneno de *L. similis*, constituindo a base para as análises funcionais e anotação subsequentes. O fluxo de processamento das leituras de RNA-seq está ilustrado na Tabela 8.

**Tabela 8 – Fluxo de processamento das leituras de RNA-Seq de *L. similis*.** O sequenciamento gerou 7.188.319 clusters e 14.376.638 leituras brutas (*raw reads*). Após trimagem e filtragem de qualidade (remoção de adaptadores, bases com Phred  $\geq 20$  e fragmentos  $\geq 50$  pb), foram obtidas 13.994.548 leituras de alta qualidade. A montagem de novo no Geneious Prime v2022.1.1 resultou em 114.227 *contigs*, dos quais 40.567 apresentaram cobertura  $\geq 50\%$ , compondo.



## 5.2 Anotação dos contigs

Os *contigs* gerados no Geneious foram analisados quanto à similaridade com sequências depositadas em bancos de dados por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A tradução das sequências de nucleotídeos foi realizada com o auxílio do ExPasy Translate, e as proteínas de interesse foram investigadas a partir de sequências consenso conhecidas, utilizando a ferramenta PHTK. Para essa análise, os *contigs* foram traduzidos nos seis frames de leitura e exportados para arquivos no formato FASTA contendo as sequências de aminoácidos. O PHTK foi empregado para detectar padrões conservados de domínios catalíticos, motivos de cisteínas e outras regiões características de toxinas, permitindo a identificação de novos componentes mesmo quando a similaridade global com sequências previamente descritas era baixa.

As buscas foram conduzidas considerando identidade mínima de 40%, *E-value*  $\leq 1 \times 10^{-4}$ , e a presença de domínios estruturais compatíveis com o sítio catalítico. As sequências identificadas foram posteriormente submetidas ao BLASTP (ferramenta para o alinhamento de sequências de aminoácidos) e agrupadas conforme o respectivo grupo enzimático.

Por meio dessa abordagem integrada, foram identificadas 98 sequências putativas de proteínas Loxtox, reconhecidas como os principais componentes tóxicos dos venenos de *Loxosceles*. Essas proteínas apresentam motivos conservados relacionados à atividade catalítica e são responsáveis por parte significativa dos efeitos dermonecróticos observados nos

envenenamentos. Além das Loxtox, foram identificadas 71 sequências putativas de metaloproteases contendo os motivos conservados de ligação ao zinco e a estrutura “*met-turn*”, ambos essenciais para a atividade catalítica dessas enzimas. Também foram detectadas sequências únicas correspondentes a hialuronidase, fosfolipase A<sub>2</sub> e serinoprotease, representando diferentes classes de enzimas potencialmente envolvidas na degradação de componentes extracelulares e na disseminação das toxinas.

Adicionalmente, foram identificadas duas sequências associadas a toxinas alergênicas, possivelmente relacionadas a respostas imunogênicas, e 17 sequências compatíveis com peptídeos inseticidas, caracterizadas por tamanhos reduzidos e motivos conservados típicos dessa classe de moléculas. Outras 26 sequências apresentaram similaridade parcial com toxinas descritas em venenos de diferentes organismos, mas sem definição clara quanto à função biológica, o que indica a necessidade de análises complementares para confirmação de suas atividades.

Por fim, 264 sequências não apresentaram similaridade significativa com proteínas conhecidas em bancos de dados públicos, sendo classificadas como “*no matches*”. Essas sequências podem representar genes novos ou pouco anotados expressos nas glândulas de veneno de *Loxosceles*. Para sustentar essa classificação, foram selecionadas algumas dessas sequências para análise manual, observando-se que, embora apresentem tamanho compatível com possíveis transcritos codificantes, padrões de cisteínas e ausência de domínios funcionais reconhecíveis, não exibem similaridade significativa em buscas através do BLAST, corroborando sua inclusão na categoria “*no matches*” (Tabela 9).

**Tabela 9 – Total de sequências putativas identificadas no transcriptoma de *L. similis*.** A primeira coluna apresenta as famílias de toxinas identificadas, enquanto a segunda coluna indica o número total de sequências detectadas pelas análises baseadas em homologia e pelas buscas guiadas por motivos conservados utilizando o programa PHTK. O conjunto de dados abrange os principais componentes do veneno, como proteínas Loxtox e metaloproteases, além proteínas alergênicas, peptídeos inseticidas, outras toxinas e no *matches*, evidenciando tanto constituintes conhecidos quanto potenciais novas moléculas do veneno.

<b>Família</b>	<b>Nº sequências putativas</b>
<b>Loxtox</b>	98
<b>Metaloprotease</b>	71
<b>Hialuronidase</b>	1
<b>Fosfolipase A2</b>	1
<b>Toxinas alergênicas</b>	2
<b>Serinoproteases</b>	1
<b>Peptídeos inseticidas</b>	17
<b>Outras toxinas</b>	26
<b>No Matches</b>	264

Essa análise revelou um conjunto diversificado de transcritos associados à produção de toxinas e enzimas com potencial papel na toxicidade. A identificação de 98 sequências putativas de Loxtox confirma a predominância desse grupo no veneno. As 71 metaloproteases detectadas, com motivos conservados de ligação ao zinco e estrutura *met-turn*, indicam a presença de enzimas ativas envolvidas na degradação tecidual e na amplificação da lesão local e sugerem grande importância dessa família de enzimas para a toxicidade do veneno de *L. similis*. De forma complementar, as sequências únicas de hialuronidase, fosfolipase A<sub>2</sub> e serinoprotease apontam para a participação de enzimas acessórias na difusão e potencialização dos efeitos tóxicos.

A detecção de toxinas alergênicas e peptídeos inseticidas evidencia a complexidade funcional do veneno e sugere que, além de moléculas com potencial tóxico em mamíferos, *L. similis* produz componentes com possível papel em defesa ou predação. Já as 26 sequências de similaridade com grupos menos estudados representam candidatos promissores a novas toxinas, cuja caracterização funcional requer análises adicionais. Por fim, foi um achado expressivo a presença de 264 sequências sem similaridade com proteínas conhecidas (“no matches”), indicando a existência de um reservatório genético inexplorado. Essas sequências podem representar novos genes específicos da espécie ou transcritos pouco conservados, reforçando a diversidade molecular do veneno e a importância de estudos transcriptômicos nesse contexto.

De modo geral, a abordagem combinada utilizando BLAST, Expasy Translate e PHTK mostrou-se eficiente para identificar tanto toxinas conhecidas quanto moléculas inéditas, revelando que o veneno de *L. similis* é um sistema molecularmente complexo, com potencial biotecnológico e relevância para o entendimento evolutivo do gênero *Loxosceles*.

### 5.3 Alinhamentos

#### 5.3.1 Família Loxtox

Além das sequências já identificadas anteriormente pelo nosso grupo (Dantas *et al.*, 2016) e indicadas no Anexo I, quatro novas sequências da família Loxtox foram detectadas, sendo duas pertencentes ao grupo s1 (Loxtox s1H e Loxtox s1I) e duas relacionadas ao grupo s11 (Loxtox s11G e Loxtox s11H). Adicionalmente, foi encontrada a sequência completa da Loxtox s1F abordada de forma parcial do trabalho de Dantas.

Os alinhamentos conduzidos pelo BLASTP e MEGA 12, considerando o algoritmo *Clustal W*, permitiu agrupar as sequências putativas de Loxtox encontradas com aquelas já determinadas nos grupos s1, s2, s3, s4, s5, s6, s7, s8, s9, s10, s11 e s12, baseando na similaridade entre os seus aminoácidos. Após identificar e confirmar o grupo ao qual pertenciam, as novas Loxtox foram nomeadas seguindo a lógica previamente estabelecida (E. Kalapothakis *et al.*, 2007): Loxtox + grupo + letra sequencial.

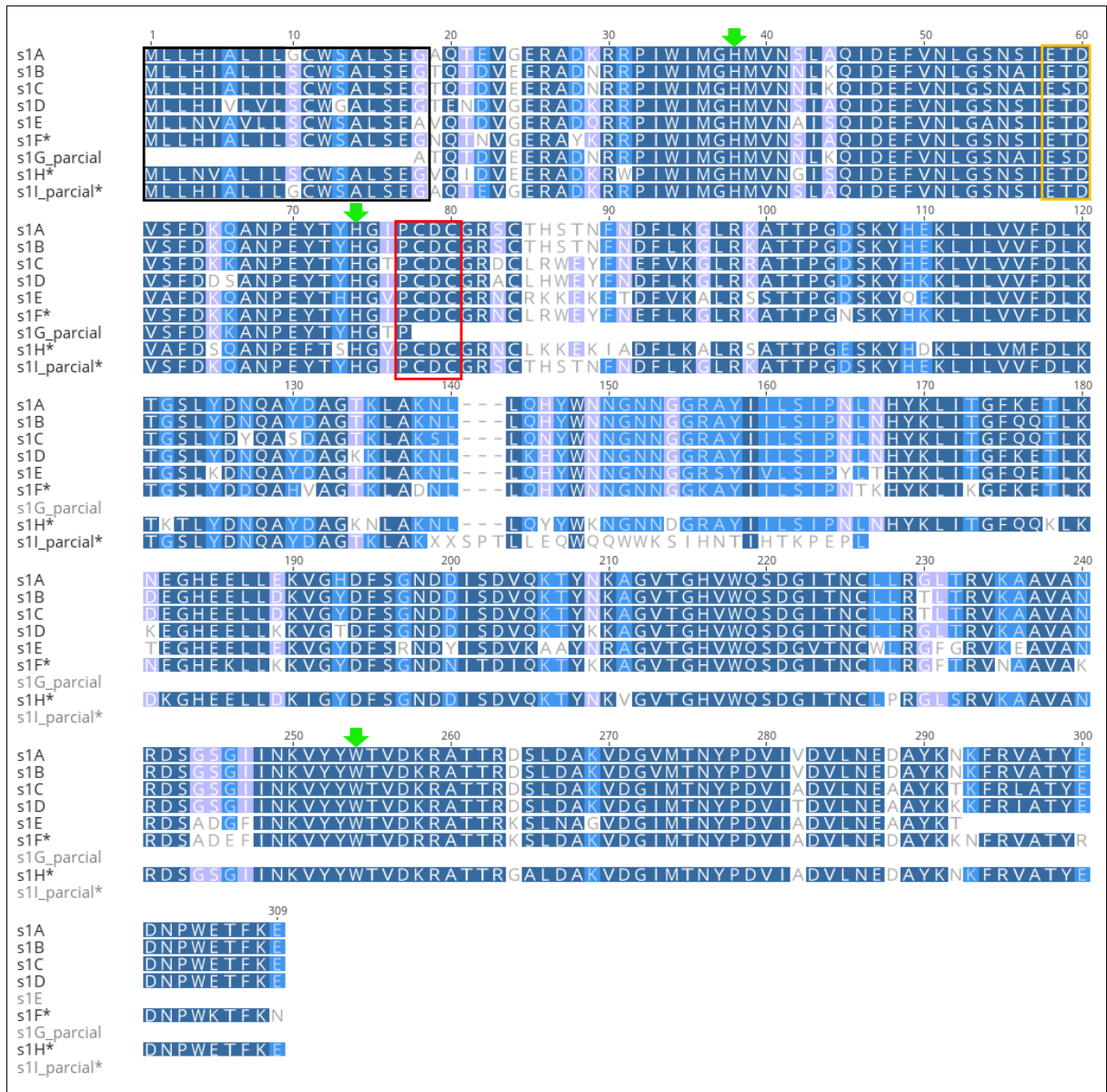
A Tabela 10 representa as sequências identificadas e as informações obtidas por BLASTP, incluindo a classificação, *E-value*, similaridade (SIMIL.), identidade (ID) e Query cover (QC). Para as sequências parciais encontradas, apenas aquelas contendo pelo menos 150 aminoácidos foram consideradas para este trabalho, visto que as Loxtox apresentam geralmente cerca de 300 aminoácidos em suas sequências.

O peptídeo sinal, determinado pela ferramenta SIGNAL IP 6.0 (disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) e que se destaca sublinhado na Tabela 10, possui a sequência deduzida: **MXLXXXXXXXXXXXXXXXXXXG**, comum a todas as sequências de Loxtox analisadas. Adicionalmente, o motivo característico do *loop* catalítico (PCDC), descrito para as Loxtox de *L. intermedia* (E. Kalapothakis *et al.*, 2007), encontra-se destacado em vermelho. As histidinas e o triptofano envolvidos na atividade catalítica dessas enzimas foram identificados e destacados em verde, enquanto o sítio de ligação do Mg<sup>2+</sup> está indicado em amarelo.

**Tabela 10 – Sequência primária e características conservadas de novos membros da família Loxtox.** O peptídeo sinal, identificado pela ferramenta Signal IP 6.0, está sublinhado, e os aminoácidos idênticos estão destacados em negrito. Os aminoácidos do *loop* catalítico estão destacados em vermelho (-PCDC). As histidinas e o triptofano envolvidos na catálise dessas enzimas estão marcados em verde, enquanto o sítio de ligação ao Mg<sup>2+</sup> está destacado em amarelo. O primeiro aminoácido da sequência madura destaca-se em azul ciano. Para os resultados dos alinhamentos, em afiliação (P) corresponde à sequência completa de aminoácidos com o peptídeo sinal; (M) corresponde à proteína madura. As colunas à direita apresentam a similaridade (SIMIL.) identidade percentual (ID) e a cobertura do alinhamento (QC).

LOXTOX						
TOXINA	SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS	AFILIAÇÃO	E-VALUE	SIMIL.	ID	QC
Loxtox s1F	<u>MLLHIALILSCWSALSEG</u> <b>N</b> QTNVGERAYKRRPI WIMG <b>M</b> VNNSIAQIDFVNLGSNSI <b>E</b> <b>T</b> <b>D</b> VSFDDK ANPEYTY <b>G</b> I <b>PCDC</b> GRNCLRWEIFNEFLKGLRK ATTPGNSKYHKKLILVFDLKTGSLYDDQAHVA GTKLADNLLQHYWNGNNGGKAYIILSIPNTK <b>H</b> Y <b>K</b> L <b>I</b> K <b>G</b> F <b>K</b> ETLKNEGHEKLLKKVGYDFSGNDNI TDIQKTYKAGVTGHVWQSDGITNCLLRGFRV NAAVAKRDSADFINKVY <b>Y</b> TVDRRATRKSLD AKVDGIMTNPVDVIADVLNEDAYKKNFRVATYR DNPWKTFFN	(P) Loxtox_s1A (ANY30960.1) <i>Loxosceles similis</i>	0.0	91%	85.2 5%	99%
		(M) Loxtox_s1D (ANY30963.1) <i>Loxosceles similis</i>	0.0	91%	86.2 7%	99%
Loxtox s1H	<u>MLLNVALILSCWSALSEG</u> <b>V</b> QIDVEERADKRPI WIMG <b>M</b> VNNGISQIDFVNLGSNSI <b>E</b> <b>T</b> <b>D</b> VAFDSQ ANPEFTS <b>G</b> V <b>PCDC</b> GRNCLKKEKIADFLKALRS ATTPGESKYHDKLILVMFDLKTLYDNQAYDA GKNLAKNLLQYYWKNNGNDGRAYIILSIPNL <b>NH</b> Y <b>K</b> L <b>I</b> T <b>G</b> F <b>Q</b> Q <b>L</b> K <b>D</b> K <b>G</b> HEELLDKIGYDFSGNDDI SDVQKTYNKVGVGTGHVWQSDGITNCLPRGLSRV KAAVANRDSGSGIINKVY <b>Y</b> TVDKRATTRGALD AKVDGIMTNPVDVIADVLNEDAYKKNFRVATYE DNPWETFKE	(P) Loxtox_s1B (ANY30961.1) <i>Loxosceles similis</i>	0.0	90%	85%	100%
		(M) Loxtox_s1B (ANY30961.1) <i>Loxosceles similis</i>	0.0	90%	85.2 6%	99%
Loxtox s1I	<u>MLLHIALILGCWSALSEG</u> <b>A</b> QTEVGERADKRPI WIMG <b>M</b> VNNSLAQIDFVNLGSNSI <b>E</b> <b>T</b> <b>D</b> VSFDDKQ ANPEYTY <b>G</b> I <b>PCDC</b> GRSCTHSTNFNDFLKGLRK ATTPGDSKYHEKLLILVFDLKTGSLYDNQAYDA GTKLAKXXSPTLLEQWQWWKSIHNTIHTKPEP L	(P) Loxtox_s1A (ANY30960.1) <i>Loxosceles similis</i>	7e <sup>-97</sup>	92%	91,0 8%	94%
		(M) Loxtox_s1A (ANY30960.1) <i>Loxosceles similis</i>	3e <sup>-79</sup>	91%	89.6 3%	93%
Loxtox s11G	<u>MLLSAVIFFIGSAVVFNQVNG</u> <b>V</b> VEERADNRKPI WDIA <b>M</b> VNDLKLVDDEYLDGANAL <b>E</b> <b>L</b> <b>D</b> VAFKDD GTAEKMY <b>G</b> V <b>PCDC</b> FRNCKRTEEFTKYMDYIRE LTPPGNSKFRSOLIMLIMDLKLRKIPNIAYAA GNSVAEKLLSSYWQNGKSGARAYIVLSLETITR PDFIKGFKDAIKSKHEELFEKIGWDFSGNEDL GDIRMYQRYGIEDHIWQGDGITNCVMRGDYRL KEAMKKNDPDYKTYTLKVY <b>T</b> SIDKSSIRHAL RLGVDVMTNYPARVKSILQEKEFGSGSHRMATY DDNPWQK	(P) Loxtox_s11D (ANY30987.1) <i>Loxosceles similis</i>	0.0	87.17%	87%	100%
		(M) Loxtox_s11D (ANY30987.1) <i>Loxosceles similis</i>	0.0	89.36%	89%	100%
Loxtox s11H	<u>MWLSAVLSFLELAVVYQVNG</u> <b>H</b> VEERADSRKPI WDIA <b>M</b> VNDLELVDEYLDGANGLE <b>E</b> <b>L</b> <b>D</b> VAFKTD GTAEKMY <b>G</b> I <b>PCDC</b> FRSCKRTEEFTKYMDYIRQ LTPPGNAKFRSELIMLIMDLKLDIEPNVAYAA GKSVAEKLLSSYWLNGESGARAYIVLSLETITR PDFINGFKDAIYKSGHDELFEKXRLGFLWQRGL GRHP	(P) Loxtox_s11C (ANY30986.1) <i>Loxosceles similis</i>	8e <sup>-134</sup>	95%	95.4 8%	98%
		(M) Loxtox_s11C (ANY30986.1) <i>Loxosceles similis</i>	2e <sup>-116</sup>	94%	94.9 2%	98%

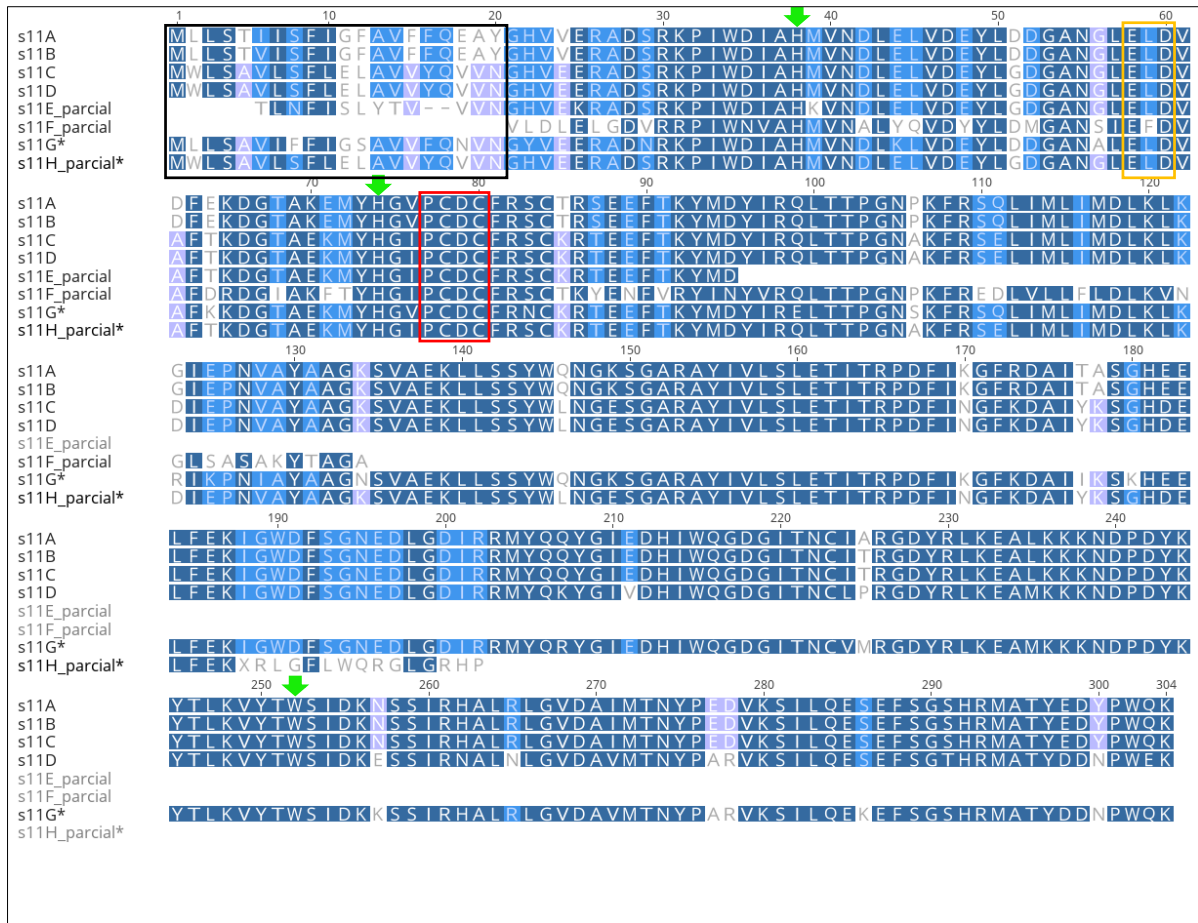
As novas sequências identificadas foram alinhadas com aquelas pertencentes ao mesmo grupo e previamente depositadas em bancos de dados públicos, a fim de avaliar o grau de conservação estrutural e funcional entre os membros da família Loxtox. O alinhamento foi conduzido no Geneious Prime 2022.2, considerando um alinhamento global com matriz de custo BLOSUM62, e é apresentado na Figura 12. As regiões totalmente conservadas (100% de identidade) estão representadas em azul escuro, aquelas com 80–99% de conservação em azul claro, e os resíduos com 60–79% de similaridade em lilás. As posições não destacadas indicam conservação inferior a 60%. Observa-se que os resíduos catalíticos característicos dessa família de enzimas permanecem altamente conservados, indicando manutenção da estrutura funcional essencial para a atividade enzimática. O *loop* catalítico (P<sup>77</sup>C<sup>78</sup>D<sup>79</sup>C<sup>80</sup>) encontra-se destacado em vermelho, enquanto as histidinas (H<sup>38</sup> e H<sup>74</sup>) e o triptofano (W<sup>255</sup>), diretamente envolvidos no processo catalítico, estão indicados com setas verdes. O sítio de ligação ao íon Mg<sup>2+</sup>, fundamental para a estabilidade e atividade da enzima, é indicado em amarelo (E<sup>58</sup>X<sup>59</sup>D<sup>60</sup>). A numeração dos aminoácidos nesse caso foi realizada com base na posição dos resíduos na sequência da Loxtox s1A.



**Figura 12 – Alinhamento múltiplo de sequências do grupo s1A das Loxtox.** Regiões 100% conservadas estão em azul escuro, aquelas com 80–99% em azul claro e com 60–79% em lilás; áreas não destacadas indicam conservação <60%. O peptídeo sinal está delimitado por retângulo preto. O loop catalítico (P<sup>77</sup>C<sup>78</sup>D<sup>79</sup>C<sup>80</sup>) aparece em vermelho, as histidinas (H<sup>38</sup>, H<sup>74</sup>) e o triptofano (W<sup>255</sup>) estão marcados com setas verdes (↓), e o sítio de ligação ao Mg<sup>2+</sup> (E<sup>58</sup>X<sup>59</sup>D<sup>60</sup>) está em amarelo. Os asteriscos (\*) indicam as sequências elucidadas neste trabalho.

O alinhamento apresentado na Figura 13, numerado de acordo com os resíduos de aminoácidos da sequência da Loxtox s11A, indica a presença dos mesmos domínios e regiões característicos da família Loxtox. Conforme estabelecido no alinhamento anterior, regiões 100% idênticas estão em azul escuro, as 80–99% conservadas em azul claro, e as 60–79% em lilás; áreas não coloridas apresentam conservação abaixo de 60%. O *loop* catalítico com destaque em vermelho corresponde a P<sup>78</sup>C<sup>79</sup>D<sup>80</sup>C<sup>81</sup>, as histidinas e triptofano correspondem a H<sup>38</sup>, H<sup>74</sup>, e W<sup>253</sup> e são apontados por setas verdes e, por fim, o sítio de ligação ao Mg<sup>2+</sup> (E<sup>58</sup>X<sup>59</sup>D<sup>60</sup>). Os aminoácidos do alinhamento estão numerados de acordo com a sequência da

Loxtos s11A e esses resultados reforçam a conservação dos elementos estruturais críticos das Loxtox, sugerindo que as novas sequências identificadas mantêm o potencial funcional típico dessa família de toxinas.



**Figura 13. Alinhamento múltiplo de sequências do grupo s11A das Loxtox.** Regiões 100% conservadas estão em azul escuro, aquelas com 80–99% em azul claro e com 60–79% em lilás; áreas não destacadas indicam conservação <60%. O peptídeo sinal está delimitado por retângulo preto. O loop catalítico (P<sup>77</sup>C<sup>78</sup>D<sup>79</sup>C<sup>80</sup>) aparece destacado em vermelho, as histidinas (H<sup>38</sup>, H<sup>74</sup>) e o triptofano (W<sup>253</sup>) estão marcados com setas verdes (↓), e o sítio de ligação ao Mg<sup>2+</sup> (E<sup>58</sup>X<sup>59</sup>D<sup>60</sup>) está indicado em amarelo. Os asteriscos (\*) indicam as sequências elucidadas neste trabalho.

Para complementar as análises de alinhamento, foram construídas as matrizes de similaridade correspondentes a cada grupo de sequências (Tabelas 11 e 12). Essas matrizes permitem quantificar o grau de identidade e divergência entre as sequências analisadas, fornecendo uma representação visual da proximidade evolutiva e funcional entre os diferentes membros da família Loxtox. A construção dessas matrizes é fundamental para identificar níveis de conservação intra e intergrupos, evidenciando possíveis subgrupos de toxinas com funções ou especificidades distintas. Valores elevados de identidade indicam forte conservação estrutural, sugerindo manutenção de propriedades catalíticas semelhantes, enquanto

divergências pontuais podem refletir mutações adaptativas relacionadas à variação de substrato ou à modulação da atividade enzimática. Dessa forma, as matrizes de alinhamento constituem uma ferramenta essencial para inferir relações evolutivas e delimitar a diversidade molecular dentro da família de toxinas analisada.

**Tabela 11. Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências pertencentes ao grupo s1 de Loxtox.** A figura foi construída por meio do agrupamento de similaridade utilizando o programa Geneious Prime (versão 2022.2). As porcentagens de identidade entre as sequências estão indicadas na matriz.

	s1A	s1B	s1C	s1D	s1E	s1F	s1G	s1H	s1I
s1A		95,42	88,24	90,85	80,56	85,25	81,67	83,33	91,08
s1B	95,42		92,81	89,22	80,21	82,95	93,33	84,97	85,99
s1C	88,24	92,81		87,58	79,24	82,95	98,33	82,68	83,33
s1D	90,85	89,22	87,58		78,82	85,25	78,33	82,35	86,96
s1E	80,56	80,21	79,24	78,82		77,43	78,33	79,17	72,61
s1F	85,25	82,95	82,95	85,25	77,43		82,76	76,72	86,86
s1G	81,67	93,33	98,33	78,33	78,33	82,76		73,33	81,67
s1H	83,33	84,97	82,68	82,35	79,17	76,72	73,33		70,70
s1I	91,08	85,99	76,43	86,96	72,61	86,86	81,67	70,70	

**Tabela 12. Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências pertencentes ao grupo s11 de Loxtox.** A figura foi construída por meio do agrupamento de similaridade utilizando o programa Geneious Prime (versão 2022.2). As porcentagens de identidade entre as sequências estão indicadas na matriz.

	s11A	s11B	s11C	s11D	s11E	s11F	s11G	s11H
s11A		99.34	89.47	84.87	85.33	59.09	86.51	79.90
s11B	99.34		90.13	85.20	85.33	59.09	86.84	80.40
s11C	89.47	90.13		95.07	88.89	56.88	86.84	95.48
s11D	84.87	85.20	95.07		88.89	56.88	87.17	95.48
s11E	85.33	85.33	88.89	88.89		57.97	87.01	88.89
s11F	59.09	59.09	56.88	56.88	57.97		55.05	56.88
s11G	86.51	86.84	86.84	87.17	87.01	55.05		80.90
s11H	79.90	80.40	95.48	95.48	88.89	56.88	80.90	

### 5.3.2 Fosfolipase A<sub>2</sub>

Pela primeira vez na literatura, uma sequência apresentando similaridade com o grupo das Fosfolipases de Classe A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) foi encontrada entre os transcritos da glândula de veneno de *L. similis* e designada LsPLA<sub>2</sub>-1 (Figura 14), onde “Ls” se refere a *L. similis*, “PLA<sub>2</sub>” a Fosfolipase A<sub>2</sub> e o sufixo “-1” indica que essa é a primeira sequência desta família de enzimas identificada nessa espécie. A LsPLA<sub>2</sub>-1 é uma proteína de alto peso molecular (~33kDa) e pI de 7,94, de acordo com o EXPASY ProtParam (disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>), com possível atividade enzimática na degradação de componentes da matriz extracelular.

1	atg	gtg	gtg	cgc	gat	tat	acc	att	gtg	tgc	tgg	gtg	ctg	ctg	ctg	ttt	ctg	ctg	ttt	aac
	M	V	V	R	D	Y	T	I	V	C	W	V	L	L	L	F	L	L	F	N
21	gtg	agc	gat	ggc	aaa	aaa	cgc	gat	aaa	gtg	ttt	att	ctg	cag	aaa	gaa	aac	ccg	gat	cat
	V	S	D	G	K	K	R	D	K	V	F	I	L	Q	K	E	N	P	D	H
41	ccg	aaa	ccg	aaa	ctg	ctg	gtg	gtg	acc	tgg	agc	agc	gaa	aaa	gaa	ggc	gat	ttt	ggc	ggc
	P	K	P	K	L	L	V	V	T	W	S	S	E	K	E	G	D	F	G	G
61	tgc	gaa	ttt	ttt	gat	gat	cag	aac	ctg	att	gat	gaa	gtg	ctg	agc	agc	gcg	agc	gat	agc
	C	E	F	F	D	D	Q	N	L	I	D	E	V	L	S	S	A	S	D	S
81	gaa	att	cag	acc	acc	agc	gaa	gaa	gaa	atg	gaa	gat	ctg	ctg	gaa	gat	tgc	acc	cag	gtg
	E	I	Q	T	T	S	E	E	E	M	E	D	L	L	E	D	C	T	Q	V
101	agc	ctg	cgc	aaa	aaa	cgc	cag	gtg	tat	ttt	cag	tat	ccg	ggc	gtg	ccg	aac	ttt	aac	gat
	S	L	R	K	K	R	Q	V	Y	F	Q	Y	P	G	V	P	N	F	N	D
121	cgc	gcg	cag	agc	acc	aac	ctg	cgc	cgc	cgc	agc	ggc	aaa	cag	cgc	cgc	agc	gaa	agc	acc
	R	A	Q	S	T	N	L	R	R	R	S	G	K	Q	R	R	S	E	S	T
141	acc	aaa	agc	acc	acc	gaa	agc	aac	ctg	gaa	atg	gaa	ggc	ccg	aaa	cag	gaa	ggc	gcg	acc
	T	K	S	T	T	E	S	N	L	E	M	E	G	P	K	Q	E	A	A	T
161	gaa	ggc	tat	gat	ggc	tgg	aac	gtg	att	ttt	ccg	ggc	acc	aaa	tgg	tgc	ggc	gcg	ggc	gat
	E	G	Y	D	G	W	N	V	I	F	P	G	T	K	W	C	G	A	G	D
181	att	gcg	aaa	aac	tat	gat	gat	ctg	ggc	ctg	cat	gaa	gat	acc	gat	aaa	tgc	tgc	gcg	gcg
	I	A	K	N	Y	D	D	L	G	L	H	E	D	T	D	K	C	C	R	A
201	cat	gat	ctg	tgc	aac	gat	acc	ctg	gcg	ccg	ggc	gcg	acc	cgc	aac	aac	ctg	acc	aac	aac
	H	D	L	C	N	D	T	L	A	P	G	A	T	R	N	N	L	T	N	N
221	agc	ctg	ttt	acc	aaa	ctg	agc	tgc	aaa	tgc	gat	cag	gat	ttt	tat	aac	tgc	gat	gat	cgc
	S	P	F	T	K	L	S	C	K	C	D	Q	D	F	Y	N	C	L	D	R
241	gtg	aac	agc	att	att	agc	aac	aaa	att	ggc	aac	gtg	tat	ttt	aac	gtg	ctg	cgc	cgc	gat
	V	N	S	I	I	S	N	K	I	G	N	V	Y	F	N	V	L	R	R	D
261	tgc	tat	gaa	ctg	gat	tat	ccg	ctg	acc	aaa	aaa	tgc	aaa	acc	ttt	cgc	agc	ctg	ctg	aaa
	C	Y	E	L	D	Y	P	L	T	K	K	C	K	T	F	R	S	L	L	K
281	att	acc	tgc	aaa	gaa	tat	gcg	cgc	aac	acc	aaa	gcg	ccg	aaa	gtg	tat	cag	tgg	aaa	agc
	I	T	C	K	E	Y	A	R	N	T	K	A	P	K	V	Y	Q	W	K	S
301	gcg	aaa	gtg	tat	aaa	aaa	ctg	ccg	ttt	ccg	ggc	ccg	att	acc	gtg	acc	ctg	ccg	ttt	
	A	K	V	Y	K	K	L	P	F	P	G	P	I	T	V	T	L	P	F	

**Figura 14 - Sequência de cDNA e aminoácidos da LsPLA<sub>2</sub>-1.** As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida da LsPLA<sub>2</sub>-1 (GenBank PX396025) são apresentadas. Na sequência proteica, o peptídeo sinal predito pela ferramenta SignalIP 5.0 está destacado em cinza. A lisina (K) em ciano indica o primeiro aminoácido da proteína madura, composta por 295 aminoácidos.

A sequência referente a LsPLA<sub>2</sub>-1 também está indicada na Tabela 13, onde são destacados o peptídeo sinal e os resíduos de cisteína do sítio catalítico (Krayem & Gargouri, 2020) predito pelo Inter Pro (disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), assim como sua afiliação relacionada a sequência primária e proteína madura. Sequências similares já foram reportadas em análises transcriptômicas de outras espécies de aranhas, como *Pamphobeteus*

*verdolaga* (Estrada-Gómez, Vargas-Muñoz, Latorre, *et al.*, 2021) and *Phoneutria boliviensis* (Estrada-Gomez *et al.*, 2015).

**Tabela 13 – Similaridade da sequência LsPLA<sub>2</sub>-1 com proteínas homólogas identificadas por meio do BLASTP.** O peptídeo sinal, predito pela ferramenta SignalP 5.0, está sublinhado, e o primeiro aminoácido da proteína madura é indicado em azul ciano. As doze cisteínas estão destacadas em amarelo, sendo dez localizadas dentro do domínio catalítico e destacadas em negrito. O sítio catalítico, conforme anotação do InterPro, está realçado em vermelho. As colunas finais apresentam a identidade de sequência (ID) e a cobertura da consulta (QC) em relação às proteínas de referência. P indica a sequência primária e M indica a proteína madura.

LsPLA <sub>2</sub>					
SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	AFILIAÇÃO	E-VALUE	SIMIL.	ID	QC
MVVRDYTIVCWVLLFLLEFNVDGKRRDKVFILQ KENPDHPPKLLVVTWSSEKEGDFGGCEFFDDQN LIDEVLSASDSEIQTTSEEEEMEDLLEDCTQVSL RKKRQVYFQYPGVNPNFNDRAQSTNLRRRSGKQRR SESTTKSTTESNLEMEGPKQEAATEGYDGWNVIF PGTKWCGAGDIAKNYDDLGLHEDTDKCCRAHDLIC NDTLAPGATRNNLTNNSPFTKLSCKCDQDFYNCL DRVNSIISNKIGNVYFNVLRDCEYELDYPLTKKC KTFRSLKICTKEYARNTRKPKVYQWKSAAKVVYKK LPFPGPITVTLPF	(P) Phospholipase A <sub>2</sub> - like (KFM82483.1) <i>Stegodyphus</i> <i>mimosarum</i>	9e <sup>-117</sup>	64%	49.72%	99%
	(M) Phospholipase A <sub>2</sub> - like (KFM82483.1) <i>Stegodyphus</i> <i>mimosarum</i>	1e <sup>-113</sup>	66%	52.66%	99%

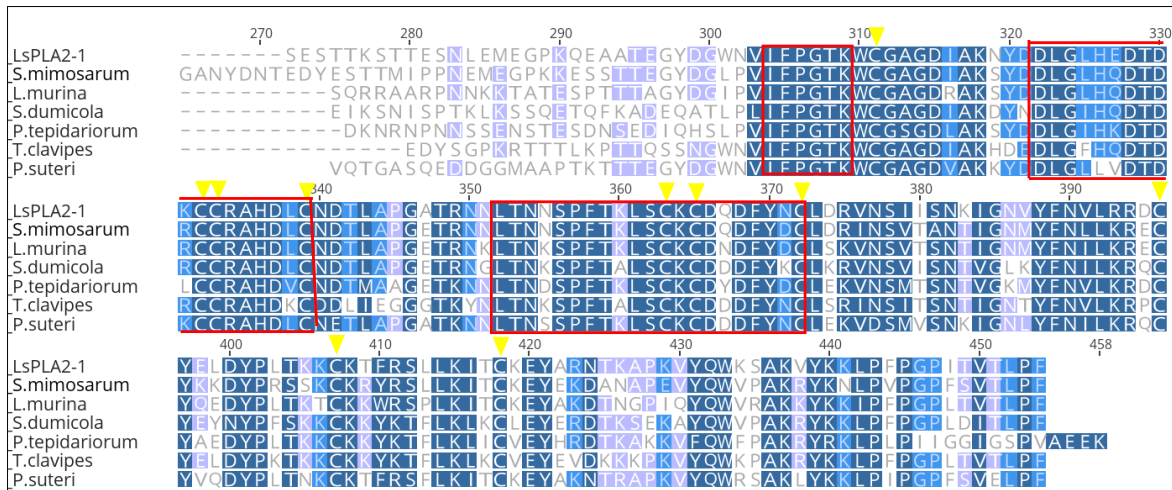
As PLA<sub>2</sub>, também conhecidas como fosfatidilcolina-2-acil hidrolase, pertencem a uma superfamília de enzimas encontradas em vários organismos, incluindo vertebrados e invertebrados (Ivanušec *et al.*, 2022; Muntean & Florea, 2025). Essa superfamília é classificada em 15 grupos distintos, organizados em cinco tipos principais PLA<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2</sub> independentes de cálcio (iPLA<sub>2</sub>), platelet-activating factor acetylhydrolase Fator acetil-hidrolase ativador de plaquetas (PAF-AH) e PLA<sub>2</sub> lisossomal (M. Murakami *et al.*, 2020). Os venenos de animais podem apresentar em sua composição as sPLA<sub>2</sub>, que são, por sua vez, subdivididas em 16 subgrupos: IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB, XIII, XIV, and XV. O grupo mais estudado é o IA derivado de serpentes da família Elapidae.

A LsPLA<sub>2</sub>-1 corresponde a uma sequência completa que mantém os resíduos de cisteína essenciais para a formação das pontes dissulfeto características da família de PLA<sub>2</sub> (Burke & Dennis, 2009; Muntean & Florea, 2025). A sequência primária e a proteína madura apresentaram 64% e 65% de similaridade, respectivamente, com a PLA<sub>2</sub> da aranha *Stegodyphus mimosarum* (UniProt A0A087U096) (Tabela 12) pertencente ao Grupo XV de PLA<sub>2</sub>, uma enzima lisossomal e independente de cálcio, responsável por degradar glicerofosfolípidios e transferir grupos acila para ceramidas. Essa classe de PLA<sub>2</sub> é bem caracterizada em mamíferos, nos quais desempenha um papel central na degradação

lisossomal de fosfolipídios, atuando de forma ótima em pH ácido e independente de íons cálcio.

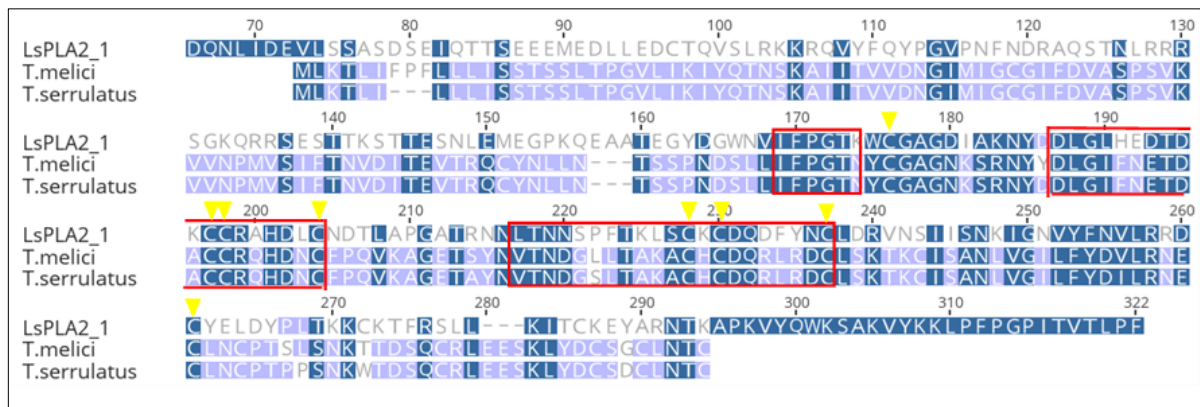
No veneno de aranhas, a sPLA<sub>2</sub> provavelmente facilita a degradação das membranas celulares da presa e promove a digestão tecidual, contribuindo para a citotoxicidade, imobilização rápida da presa e interações sinérgicas com outros componentes do veneno, que amplificam os efeitos tóxicos gerais. Em um estudo conduzido por Estrada-Gómez e colaboradores, um dos *contigs* obtidos da análise transcriptômica da aranha *P. verdolaga* apresentou aproximadamente 80% de similaridade de sequência com a PLA<sub>2</sub> de *S. mimosarum* e também semelhança com sequências de PLA<sub>2</sub> de outros táxons, como insetos, lagartos e carrapatos, sugerindo que múltiplos eventos de duplicação gênica contribuíram para a ampla diversificação das PLA<sub>2</sub> em *P. verdolaga*, fornecendo suporte filogenético (>50%) para a alta similaridade dessas sequências com proteínas descritas em diferentes famílias de aranhas (Estrada-Gómez *et al.*, 2021).

Embora relativamente poucos estudos tenham se concentrado nas enzimas PLA<sub>2</sub> de venenos de aranhas, diversas sequências já foram identificadas e depositadas em bancos de dados públicos. O refinamento dos parâmetros do BLASTP para o alinhamento da LsPLA<sub>2</sub>-1 com isoformas de aranhas revelou similaridades significativas entre as sequências. Os resultados do alinhamento estão apresentados na Figura 15, destacando os principais motivos catalíticos: IFPGTKWCG (resíduos 304–318), DLGXXXDTDxCCRAHDXC (resíduos 322–339) e LTNXSPFTXLsCKCDXDFYXC (resíduos 352–372). Foi identificado um conjunto conservado de 12 resíduos de cisteína, dos quais 10 estão localizados dentro do domínio catalítico, conforme destacado em amarelo na Figura 15: C<sup>311</sup>, C<sup>332</sup>, C<sup>333</sup>, C<sup>339</sup>, C<sup>363</sup>, C<sup>365</sup>, C<sup>372</sup>, C<sup>396</sup>, C<sup>407</sup> e C<sup>418</sup>. A numeração dos resíduos de aminoácidos corresponde à proteína madura LsPLA<sub>2</sub>-1.



**Figura 15** – Alinhamento da LsPLA<sub>2-1</sub> com sequências de PLA<sub>2</sub> de outras espécies de aranhas. Os resíduos de cisteína conservados estão destacados em amarelo (▼), resíduos idênticos em azul escuro. Os destaques em azul claro correspondem a similaridades entre 80 a 99% e lilás entre 60 a 79%. Aminoácidos não marcados correspondem a regiões com menos de 60% de similaridade. *S. mimosarum* (KFM82483.1), *L. murina* (WBW70078.1), *S. dumicola* (XP\_035222170.1), *P. tepidariorum* (XP\_071035760.1), *T. clavipes* (GFX25397.1) e *P. suteri* (QHA25180.1). A numeração dos resíduos foi atribuída de acordo com a sequência da LsPLA<sub>2-1</sub> (PX396025).

Embora o conhecimento atual sobre PLA<sub>2</sub> em aranhas ainda seja limitado, estudos mais abrangentes estão disponíveis para escorpiões, cujas sequências também apresentam similaridades com LsPLA<sub>2-1</sub>, sugerindo uma possível conservação estrutural ou funcional entre linhagens distantes de aracnídeos. No contexto dos escorpiões, um estudo anterior do nosso grupo forneceu a primeira evidência de atividade funcional de PLA<sub>2</sub> no veneno de *Tityus melici*, confirmada por meio de um ensaio hemolítico indireto. A análise transcriptômica identificou um gene de sPLA<sub>2</sub> com 98% de similaridade de sequência em relação ao seu homólogo em *Tityus serrulatus* (Y. Kalapothakis *et al.*, 2021, 2024). A Figura 16 mostra o alinhamento da LsPLA<sub>2-1</sub> com as sequências de PLA<sub>2</sub> de *T. serrulatus* e *T. melici*, destacando o sítio catalítico parcialmente similar e a conservação de 8 resíduos de cisteínas. Embora a atividade enzimática de sPLA<sub>2</sub> ainda não tenha sido demonstrada em venenos de *Loxosceles*, a potencial contribuição dessas enzimas para o loxoscelismo ressalta a importância de investigações adicionais sobre seu possível papel funcional nos venenos de aranhas.



**Figura 16 – Alinhamento da LsPLA<sub>2</sub>-1 com seqüências de PLA<sub>2</sub> de escorpiões.** Os resíduos de cisteína conservados estão destacados em amarelo (▼), resíduos idênticos em azul escuro. Os destaques em azul claro correspondem a similaridades entre 80 a 99% e lilás entre 60 a 79%. Aminoácidos não marcados correspondem a regiões com menos de 60% de similaridade. *T. melici* (WLF82745.1) e *T. serrulatus* (JAW07019.1). A numeração dos resíduos foi atribuída de acordo com a proteína madura LsPLA<sub>2</sub>-1.

A identificação da LsPLA<sub>2</sub>-1 em *L. similis* representa um avanço significativo na compreensão atual da composição do veneno dessa espécie, uma vez que análises transcriptômicas anteriores haviam detectado apenas enzimas fosfolipases D, como as proteínas da família Loxtox, como os principais contribuintes para a toxicidade do veneno (Dantas *et al.*, 2016). Assim, a detecção da LsPLA<sub>2</sub>-1 introduz uma nova classe enzimática no conjunto de componentes do veneno de *L. similis*, revelando uma maior diversidade de tipos de fosfolipases entre as aranhas do gênero *Loxosceles*.

Embora transcritos semelhantes a PLA<sub>2</sub> já tenham sido identificados nos transcriptomas das glândulas de veneno de outras aranhas, suas funções biológicas precisas ainda permanecem pouco esclarecidas. A descoberta de PLA<sub>2</sub> em *Loxosceles* sugere uma história evolutiva mais complexa das proteínas de veneno e levanta novas questões relevantes para pesquisas funcionais e farmacológicas sobre a toxicidade do veneno das aranhas marrons.

Diante desses achados, ainda não está claro se a LsPLA<sub>2</sub>-1 de *L. similis* atua como uma toxina secretada no veneno, uma enzima endógena, ou ambas. Tipicamente, as PLA<sub>2</sub> secretadas estão envolvidas nos mecanismos de envenenamento, contribuindo para a imobilização da presa e danos teciduais, enquanto as PLA<sub>2</sub> endógenas participam de processos celulares, como remodelamento de membranas, transdução de sinais e produção de eicosanoides, não estando diretamente relacionadas à toxicidade do veneno. Determinar o contexto biológico de expressão e atividade da LsPLA<sub>2</sub>-1 é, portanto, essencial para compreender o significado funcional dessa enzima no veneno de *L. similis*.

### 5.3.3 Metaloproteases

Em relação às metaloproteases (MPs), foram identificadas pela primeira vez 11 sequências completas e 2 parciais relacionadas a essa família de proteínas entre os transcritos das glândulas de veneno de *L. similis* (Tabela 14). As sequências foram designadas com o prefixo “LsMP” (Ls = *L. similis* / MP = metaloprotease), seguido por um número de identificação de acordo com sua ordem de descoberta.

Essas sequências apresentaram conservação do sítio de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH) além do motivo estrutural *Met-turn* (SXMXY) (Gomis-Rüth *et al.*, 2012; Stöcker *et al.*, 1995). Além disso, o tamanho das sequências foi consistente com a faixa esperada de aproximadamente 200–250 resíduos de aminoácidos, critério que foi utilizado durante o processo de identificação.

A família das metaloproteases é caracterizada por uma ampla diversidade e seletividade de substratos, e todas as enzimas desse grupo possuem a sequência de ligação ao metal no domínio catalítico. Elas são produzidas como moléculas zimogênicas, sendo secretadas na forma de pro-enzimas latentes que necessitam passar por uma clivagem proteolítica do domínio amino-terminal para serem ativadas (Gomis-Rüth *et al.*, 2012).

**Tabela 14 – Metaloproteases (MPs) putativas da glândula de veneno de *L. similis*.** As sequências de metaloproteases de *L. similis* foram alinhadas com sequências do banco de dados. O peptídeo sinal previsto pelo SignalP 6.0 se encontra sublinhado; pró-peptídeos identificados por Pfam 37.4/InterPro aparecem com letras azuis; o primeiro aminoácido previsto da proteína madura está marcado em azul ciano. Motivos de ligação ao zinco estão destacados em vermelho e o *Met-turn* em magenta. A tabela também apresenta os escores de alinhamento obtidos no BLASTp tanto para a sequência primária (P) quanto para a proteína madura (M). Dados de *E-value*, similaridade, identidade e QC também são indicados.

METALOPROTEASES						
TOXIN	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	AFILIAÇÃO	E-VALUE	SIMIL.	ID	QC
LsMP 1	MIRLLWFFVFLSGVLGFQSEEDIADENQFQVEEDTALRED ELMERNAVLQDRRLWPNVGIYISIDEKVKSSTKVIRRVKMK HIEDTTCIRFKERTDERYYLLIRRSKKHPFSCFAHVGDFYP TELHMSLAPLCSRFGILILHEMCHVIGFYHEHNRDRDDYL TVKFKNIPKRYRKSFEKLSPSSTRITIGPFYDYSIMTYSYF TFSKAPGLLKVLPKQKGAVLQHPLYKHKLSDWDIKKINI LYKCKEKSRRQAPDKTSS	(P) Astacin-line metaloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	8e <sup>-60</sup>	60%	44.49%	95%
		(M) Astacin-line metaloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	2e <sup>-56</sup>	63%	48.04%	96%
LsMP 2	MTRRPPVIPHSLKLVVVAHKEKYDCRSIKCFLLTFSRL FHRGTLCCFLLTPLTMMVNPVILAILVGGLCISIEAATI SHDPAPEDVDLAEEDMLLGEPELEERNAIKYDTRLWPKDT VIYYIDGLRLYSRRIKKAMRHIEENTCIKFKERENEKGYV KIYNGKLTFCFADAGYYPFEQRMSLGLGCRRFAGAIVHELV EVLGFYHEHQRPDRDNYVTVNEDNLKEGAAREYEIKDADK IRVYGPFDYDSIMTYGETDASKDAARLKTMTAKQSGVTLK NPALKSGLTDLDIKKINSLYDCPGKDKFPET	(P) Astacin-line metaloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	9e <sup>-103</sup>	72%	61.57%	82%
		(M) Astacin-line metaloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	1e <sup>-102</sup>	78%	61.57%	99%
LsMP 3	MIHFLWFVFIISVGLCFQSEEDDHFHIEEDMALREDELM ERNAISPSDRSLWPNVGIYISIDEKVKGSKNVIQVRVMKHE DTCIRFKERTNERYYLLIRRSKKHPFSCFADVGFYEGEM HMSLAPLCSRFGILILHEMCHVIGFYHEHNRDRDDYLTVN LENVPEKHRRYLEKVRPSSTRITIGPFYDYSIMTYSYFTYS KAPGILKVLDPKEKGAVLQHPLYKHKLSDWDIKKINILYK CDEKSRRQAPDKTSS	(P) Astacin-line metaloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3 <sup>-58</sup>	59%	42.98%	95%
		(M) Astacin-line metaloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	4e <sup>-60</sup>	62%	47.06%	96%
LsMP 4	MIHFLWFVFIISVGLCFQSEEDTVDENHFGIEGDMALRED ELMERNAISPSDRSLWPNVGIYISIDEKVRGSKNVIQVRVMK HIEDTTCIRFKERTNERYYLLIRRSKKHPFSCFADVGFYEG GDMHMSLAPLCSRFGILILHEMCHVIGFYHEHNRDRDDYL TVNLENVPEKHRRYLEKVRPSSTRITIGPFYDYSIMTYSYF TYSKAPGILKVLDPKEKGAVLQHPLYKHKLSDWDIKKINI LYKCKEKSRRQAPDETSS	(P) Astacin-line metaloprotease toxin 2 (C9D7R2.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	6e <sup>-59</sup>	58%	41.41%	97%
		(M) Astacin-line metaloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>-60</sup>	62%	47.55%	96%
LsMP 5	MIRYICVLGCFVSVFGDFHFTDPYPLGDGYLVEDDILLR EDELLEENAVPSDRQLWPNVGVAYTISPCLKWFENKIKKA MKHYEDRTTCIRFKERTNERYYLLNIFRGRMFTCYAEGVMKG MEQRMSLGYGCRWFGVILHELGHVIGFYHEHSRVDREYV TINYNNI IKGEEHNYDKLNPKNKTRTIGPFYDYSIMTYAHY GASKFPGLKVLVMEAKKGAYLWSVSQKGLSDWDVKKINI LYKCKEKNTTTT	(P) Astacin-line metaloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	4e <sup>-77</sup>	64%	52.76%	98%
		(M) Astacin-like metaloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>L. intermedia</i>	1e <sup>-75</sup>	56%	56.16%	98%

LsMP 6	MNMRVACFFTFLLVVTFGY <del>Y</del> F <del>F</del> K <del>T</del> G <del>D</del> G <del>K</del> Y <del>L</del> V <del>E</del> E <del>D</del> M <del>I</del> L <del>G</del> K <del>D</del> S L <del>M</del> E <del>F</del> N <del>A</del> V <del>P</del> T <del>S</del> R <del>L</del> W <del>P</del> N <del>G</del> V <del>V</del> I <del>E</del> I <del>D</del> P <del>K</del> L <del>S</del> V <del>T</del> G <del>L</del> I <del>K</del> K <del>A</del> M <del>K</del> H Y <del>E</del> D <del>R</del> T <del>C</del> I <del>R</del> F <del>K</del> E <del>R</del> T <del>N</del> E <del>R</del> S <del>Y</del> V <del>G</del> L <del>R</del> R <del>S</del> E <del>S</del> H <del>P</del> T <del>C</del> F <del>S</del> D <del>V</del> G <del>F</del> F <del>Q</del> S E <del>M</del> Q <del>M</del> A <del>L</del> G <del>T</del> T <del>C</del> T <del>I</del> F <del>G</del> V <del>I</del> L <del>H</del> E <del>L</del> G <del>H</del> V <del>V</del> G <del>F</del> Y <del>H</del> H <del>R</del> R <del>V</del> D <del>R</del> D <del>D</del> Y <del>L</del> N I <del>N</del> I <del>K</del> N <del>V</del> P <del>K</del> A <del>Y</del> L <del>K</del> Y <del>M</del> E <del>K</del> L <del>S</del> P <del>N</del> N <del>T</del> R <del>T</del> I <del>G</del> P <del>F</del> D <del>Y</del> N <del>S</del> I <del>M</del> M <del>Y</del> S <del>D</del> F <del>T</del> Y <del>S</del> K <del>F</del> P <del>G</del> I <del>L</del> K <del>V</del> I <del>K</del> P <del>Q</del> K <del>G</del> X <del>F</del> L <del>K</del> S <del>V</del> A <del>Q</del> K <del>T</del> K <del>L</del> S <del>D</del> W <del>D</del> V <del>K</del> K <del>I</del> N <del>X</del> L X <del>X</del> C <del>D</del> K <del>N</del> I <del>N</del> F <del>L</del> D <del>V</del> P <del>I</del> T <del>Q</del> F <del>G</del> F <del>L</del> R <del>N</del> T <del>F</del> Q <del>E</del> N <del>T</del> L <del>L</del> L <del>R</del> L <del>D</del> Y <del>F</del> Q <del>N</del> T <del>R</del> K <del>F</del> R <del>V</del> G <del>K</del> I <del>G</del> V <del>H</del> H <del>R</del> V <del>I</del> V <del>K</del> R <del>S</del> N <del>C</del> S <del>R</del> V <del>I</del> W <del>T</del> S <del>R</del> K	(P) Astacin-line metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	2e <sup>60</sup>	60%	46.53%	75%
	(M) Astacin-like metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>L. intermedia</i>	2e <sup>61</sup>	63%	48.26%	75%	
LsMP 7	M <del>K</del> D <del>I</del> G <del>V</del> R <del>I</del> L <del>L</del> L <del>L</del> G <del>G</del> I <del>S</del> A <del>C</del> I <del>G</del> T <del>D</del> A <del>A</del> N <del>D</del> D <del>S</del> L <del>P</del> K <del>G</del> R <del>R</del> L <del>V</del> G <del>D</del> M L <del>I</del> R <del>E</del> D <del>Q</del> L <del>S</del> E <del>F</del> N <del>A</del> V <del>L</del> E <del>D</del> S <del>Q</del> L <del>W</del> P <del>N</del> G <del>T</del> I <del>Y</del> Y <del>T</del> V <del>D</del> L <del>G</del> W <del>L</del> N <del>V</del> L <del>F</del> K <del>I</del> R <del>L</del> E <del>S</del> A <del>M</del> R <del>Y</del> E <del>E</del> N <del>T</del> C <del>L</del> K <del>F</del> K <del>E</del> R <del>T</del> N <del>E</del> K <del>Y</del> V <del>V</del> K <del>I</del> Y <del>K</del> G <del>D</del> G <del>V</del> C <del>F</del> S <del>D</del> V <del>G</del> Y <del>F</del> P <del>I</del> G <del>E</del> M <del>R</del> M <del>S</del> L <del>G</del> D <del>C</del> R <del>K</del> Y <del>G</del> I <del>M</del> I <del>H</del> E <del>L</del> G <del>H</del> V <del>I</del> G <del>F</del> Y <del>H</del> H <del>S</del> R <del>P</del> D <del>R</del> D <del>D</del> Y <del>I</del> N <del>V</del> N <del>T</del> K <del>N</del> L <del>A</del> V <del>A</del> N <del>D</del> P <del>D</del> F <del>V</del> K <del>L</del> A <del>S</del> N <del>R</del> T <del>R</del> M <del>I</del> G <del>P</del> F <del>D</del> Y <del>D</del> S <del>I</del> M <del>I</del> Y <del>G</del> E <del>Y</del> D <del>G</del> S <del>K</del> D <del>N</del> T <del>K</del> L <del>K</del> V <del>M</del> T <del>A</del> K <del>K</del> P <del>G</del> V <del>I</del> L <del>K</del> N <del>P</del> V <del>E</del> K <del>D</del> K <del>I</del> T <del>A</del> A <del>D</del> I <del>K</del> K <del>I</del> N <del>T</del> L <del>Y</del> K <del>C</del> P <del>N</del> K <del>D</del> K <del>Y</del> T	(P) Astacin-like metalloprotease toxin 2 (C9D7R2.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	1e <sup>82</sup>	68%	52.16%	98%
	(M) Astacin-like metalloprotease toxin 2 (C9D7R2.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>77</sup>	70%	53.62%	100%	
LsMP 8	M <del>L</del> Q <del>Y</del> I <del>A</del> V <del>L</del> V <del>L</del> Y <del>F</del> G <del>E</del> I <del>C</del> F <del>G</del> F <del>E</del> A <del>V</del> R <del>R</del> R <del>R</del> P <del>W</del> E <del>N</del> K <del>S</del> L <del>F</del> E <del>G</del> D <del>I</del> V <del>A</del> R <del>R</del> G <del>I</del> T <del>D</del> R <del>S</del> A <del>V</del> A <del>K</del> D <del>K</del> Y <del>L</del> W <del>P</del> E <del>G</del> I <del>I</del> Y <del>G</del> I <del>A</del> P <del>S</del> L <del>E</del> S <del>D</del> R <del>E</del> T <del>I</del> E <del>S</del> A M <del>R</del> H <del>I</del> E <del>S</del> K <del>T</del> C <del>I</del> R <del>F</del> K <del>E</del> N <del>T</del> D <del>T</del> A <del>V</del> V <del>L</del> I <del>V</del> K <del>D</del> T <del>G</del> C <del>Y</del> S <del>H</del> I <del>G</del> R <del>D</del> G <del>V</del> P Q <del>P</del> L <del>S</del> L <del>G</del> R <del>G</del> C <del>L</del> D <del>F</del> G <del>T</del> I <del>V</del> H <del>E</del> L <del>L</del> H <del>S</del> V <del>G</del> F <del>Y</del> H <del>H</del> H <del>T</del> R <del>S</del> D <del>R</del> D <del>D</del> Y <del>I</del> D <del>I</del> Y <del>W</del> D <del>N</del> I <del>D</del> E <del>P</del> E <del>Y</del> E <del>Q</del> F <del>D</del> K <del>L</del> L <del>P</del> T <del>K</del> N <del>R</del> L <del>I</del> N <del>D</del> F <del>D</del> Y <del>N</del> S <del>I</del> M <del>M</del> Y <del>G</del> E <del>L</del> A <del>F</del> S <del>I</del> D <del>D</del> I <del>S</del> P <del>T</del> M <del>K</del> P <del>K</del> S <del>G</del> V <del>K</del> L <del>I</del> E <del>V</del> H <del>E</del> K <del>K</del> G <del>L</del> S <del>E</del> S <del>D</del> I <del>E</del> R <del>V</del> N <del>T</del> L <del>Y</del> K C <del>S</del> T <del>R</del> V <del>S</del> H <del>Q</del> S <del>S</del> V	(P) Astacin-line metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	9e <sup>67</sup>	59%	46.37%	96%
	(M) Astacin-line metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	7e <sup>60</sup>	62%	50.00%	95%	
LsMP 9	M <del>K</del> L <del>Y</del> I <del>L</del> A <del>S</del> L <del>L</del> L <del>G</del> A <del>V</del> C <del>A</del> Y <del>E</del> D <del>L</del> E <del>V</del> N <del>L</del> G <del>D</del> L <del>P</del> M <del>Q</del> N <del>P</del> D <del>L</del> F <del>L</del> G <del>D</del> I <del>L</del> G <del>I</del> S <del>G</del> P <del>D</del> D <del>R</del> N <del>A</del> I <del>P</del> S <del>L</del> A <del>R</del> R <del>W</del> F <del>K</del> K <del>E</del> V <del>P</del> Y <del>E</del> I <del>D</del> S <del>L</del> T <del>A</del> Y <del>K</del> Q <del>I</del> V <del>D</del> A <del>M</del> E <del>D</del> Y <del>H</del> I <del>K</del> T <del>C</del> V <del>K</del> F <del>K</del> E <del>R</del> T <del>T</del> E <del>K</del> N <del>Y</del> I <del>R</del> L <del>F</del> A <del>G</del> Q <del>C</del> Y <del>S</del> V <del>G</del> M <del>M</del> G <del>M</del> P <del>A</del> Q <del>P</del> V <del>S</del> L <del>G</del> R <del>G</del> C <del>I</del> F <del>K</del> G <del>T</del> I <del>V</del> H <del>E</del> L <del>G</del> H <del>A</del> L <del>G</del> F <del>F</del> H <del>E</del> Q <del>N</del> R <del>S</del> D <del>R</del> D <del>D</del> H <del>L</del> I <del>I</del> Y <del>W</del> Q <del>N</del> I <del>Q</del> K <del>G</del> M <del>E</del> T <del>Q</del> F <del>A</del> L <del>L</del> K <del>P</del> H <del>E</del> N <del>L</del> L <del>L</del> D <del>K</del> F <del>D</del> Y <del>N</del> S <del>I</del> M <del>L</del> Y <del>G</del> N <del>T</del> A <del>F</del> S <del>K</del> D <del>G</del> R <del>S</del> L <del>T</del> M <del>V</del> A <del>K</del> T <del>G</del> V <del>P</del> L <del>K</del> E <del>T</del> Y <del>D</del> K <del>P</del> G <del>L</del> S <del>I</del> S <del>D</del> V <del>V</del> V <del>K</del> K <del>M</del> Y N <del>C</del>	(P) Astacin-line metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>57</sup>	57%	41.49%	97%
	(M) Astacin-line metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>54</sup>	82%	44.95%	100%	
LsMP 10	M <del>I</del> P <del>H</del> V <del>C</del> L <del>L</del> V <del>L</del> L <del>T</del> A <del>G</del> F <del>F</del> M <del>C</del> I <del>A</del> S <del>A</del> P <del>T</del> D <del>P</del> D <del>A</del> D <del>D</del> P <del>T</del> F <del>E</del> G <del>R</del> I <del>V</del> F <del>E</del> G <del>D</del> I <del>L</del> I <del>R</del> K <del>E</del> Q <del>L</del> T <del>M</del> E <del>F</del> N <del>A</del> I <del>S</del> F <del>E</del> N <del>M</del> R <del>W</del> P <del>N</del> A <del>T</del> I <del>V</del> Y <del>K</del> L <del>A</del> G <del>I</del> Y <del>A</del> L <del>F</del> P <del>G</del> D <del>I</del> K <del>K</del> A <del>M</del> R <del>H</del> I <del>E</del> E <del>N</del> T <del>C</del> I <del>K</del> F <del>K</del> P <del>R</del> K <del>N</del> E <del>E</del> G <del>Y</del> V <del>K</del> I <del>Y</del> K <del>G</del> N <del>K</del> E <del>S</del> C <del>F</del> A <del>D</del> I <del>G</del> Y <del>F</del> A <del>K</del> E <del>Q</del> R <del>L</del> S <del>L</del> G <del>S</del> G <del>C</del> K <del>I</del> F <del>G</del> R <del>I</del> L <del>H</del> E <del>M</del> G <del>H</del> T <del>I</del> G <del>L</del> F <del>H</del> E <del>H</del> T <del>R</del> P <del>D</del> R <del>D</del> Q <del>Y</del> I <del>T</del> V <del>H</del> E <del>D</del> N <del>I</del> R <del>P</del> S <del>S</del> K <del>R</del> N <del>Y</del> K <del>T</del> P <del>A</del> S <del>M</del> T <del>R</del> L <del>I</del> G <del>P</del> F <del>D</del> Y <del>H</del> S I <del>M</del> Y <del>G</del> E <del>N</del> A <del>G</del> S <del>I</del> D <del>P</del> M <del>H</del> L <del>K</del> T <del>M</del> E <del>A</del> N <del>T</del> P <del>G</del> V <del>T</del> L <del>I</del> S <del>S</del> R <del>Y</del> K <del>D</del> R <del>L</del> T <del>D</del> L D <del>I</del> K <del>K</del> I <del>N</del> T <del>L</del> Y <del>N</del> C <del>P</del> G <del>K</del> D <del>K</del> F <del>N</del>	(P) Astacin-like metalloprotease toxin 2 (C9D7R2.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	9e <sup>-166</sup>	89%	84.88%	100%
	(M) Astacin-like metalloprotease toxin 2 (C9D7R2.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	1e <sup>-140</sup>	93%	89.22%	100%	
LsMP 11	M <del>F</del> E <del>T</del> A <del>V</del> M <del>K</del> S <del>T</del> K <del>I</del> I <del>A</del> I <del>L</del> A <del>G</del> V <del>L</del> Y <del>L</del> C <del>I</del> E <del>A</del> E <del>L</del> E <del>A</del> R <del>E</del> I <del>L</del> E <del>T</del> D <del>D</del> M <del>L</del> L <del>E</del> E <del>T</del> P <del>L</del> M <del>E</del> R <del>N</del> A <del>L</del> N <del>Q</del> P <del>S</del> K <del>L</del> W <del>P</del> N <del>G</del> V <del>V</del> Y <del>K</del> F <del>T</del> G <del>L</del> R <del>L</del> Y <del>R</del> G <del>L</del> L <del>R</del> R V <del>M</del> K <del>H</del> I <del>S</del> D <del>N</del> T <del>C</del> I <del>Q</del> F <del>K</del> E <del>K</del> T <del>A</del> S <del>E</del> K <del>A</del> H <del>V</del> D <del>I</del> Y <del>N</del> G <del>L</del> F <del>T</del> C <del>F</del> A <del>D</del> M <del>G</del> Y F <del>P</del> N <del>A</del> R <del>H</del> R <del>L</del> S <del>L</del> G <del>F</del> G <del>C</del> R <del>S</del> F <del>G</del> A <del>I</del> L <del>H</del> E <del>F</del> G <del>H</del> V <del>L</del> G <del>L</del> Y <del>H</del> E <del>H</del> Q <del>R</del> P <del>D</del> R <del>N</del> T <del>Y</del> V <del>T</del> V <del>N</del> F <del>D</del> N <del>I</del> Q <del>Q</del> A <del>N</del> K <del>D</del> F <del>K</del> M <del>R</del> F <del>Y</del> N <del>N</del> T <del>R</del> V <del>I</del> G <del>P</del> F <del>D</del> Y <del>D</del> S <del>I</del> M <del>I</del> Y G <del>E</del> N <del>D</del> A <del>R</del> K <del>S</del> S <del>F</del> G <del>P</del> A <del>T</del> L <del>K</del> P <del>T</del> Q <del>A</del> G <del>V</del> T <del>L</del> L <del>N</del> P <del>A</del> Q <del>S</del> A <del>M</del> A <del>L</del> D <del>I</del> K <del>K</del> I <del>N</del> T <del>L</del> Y <del>N</del> C <del>A</del> G <del>K</del> D <del>K</del> F <del>P</del> E	(P) Astacin-line metalloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	4e <sup>-118</sup>	77%	64.78%	97%
	(M) Astacin-line metalloprotease toxin 3 (C9D7R3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	2e <sup>-106</sup>	81%	70.97%	99%	
LsMP 12 (parcial)	M <del>I</del> L <del>G</del> K <del>D</del> S <del>L</del> M <del>E</del> R <del>N</del> A <del>V</del> P <del>T</del> S <del>R</del> L <del>W</del> P <del>N</del> G <del>V</del> V <del>I</del> E <del>I</del> D <del>P</del> K <del>L</del> S <del>V</del> T <del>G</del> L I <del>K</del> K <del>A</del> M <del>K</del> H <del>Y</del> E <del>D</del> R <del>T</del> C <del>I</del> R <del>F</del> K <del>E</del> R <del>T</del> N <del>E</del> R <del>S</del> Y <del>V</del> R <del>I</del> R <del>R</del> S <del>E</del> S <del>H</del> P <del>T</del> C <del>F</del> S D <del>V</del> G <del>F</del> F <del>Q</del> S <del>E</del> M <del>Q</del> A <del>L</del> G <del>T</del> T <del>C</del> T <del>I</del> F <del>G</del> V <del>I</del> L <del>H</del> E <del>L</del> G <del>H</del> V <del>I</del> G <del>F</del> Y <del>H</del> H <del>R</del> R <del>V</del> D <del>R</del> D <del>D</del> Y <del>L</del> T <del>I</del> N <del>I</del> K <del>N</del> V <del>P</del> K <del>A</del> Y <del>L</del> K <del>Y</del> M <del>E</del> K <del>L</del> S <del>P</del> N <del>N</del> T <del>R</del> T <del>I</del> G <del>P</del> F <del>D</del> Y <del>N</del> S <del>I</del> M <del>M</del> Y <del>S</del> D <del>F</del> T <del>Y</del> S <del>K</del> F <del>P</del> G <del>I</del> L <del>K</del> V <del>I</del> K <del>P</del> Q <del>K</del> G <del>V</del> F <del>L</del> K <del>S</del> V <del>A</del> Q <del>K</del> T <del>L</del> S <del>D</del> W <del>D</del> V <del>K</del> K <del>I</del> N <del>I</del> L <del>Y</del> K <del>C</del> D <del>K</del> K <del>I</del>	Astacin-like metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	2e <sup>66</sup>	64%	48.78%	95%

LsMP 13 (parcial)	>LsMP13 parcial	Astacin-like metalloprotease toxin 1 (A0FKN6.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>-42</sup>	67%	53.49%	94%
	MKHIEDRTCLKFKKEYTGLELDGYIRIFSGEGCYSYWGRVGG MQPVSLGRGCEPLGTI I <b>HEL</b> VHAI <b>CFDHI</b> QNRSDRDDYLI IYWNINMKGAIDQFDKLPHENRLITPFDYDSI <b>MLY</b> GERS FSKRVSKTMVAKKRA					

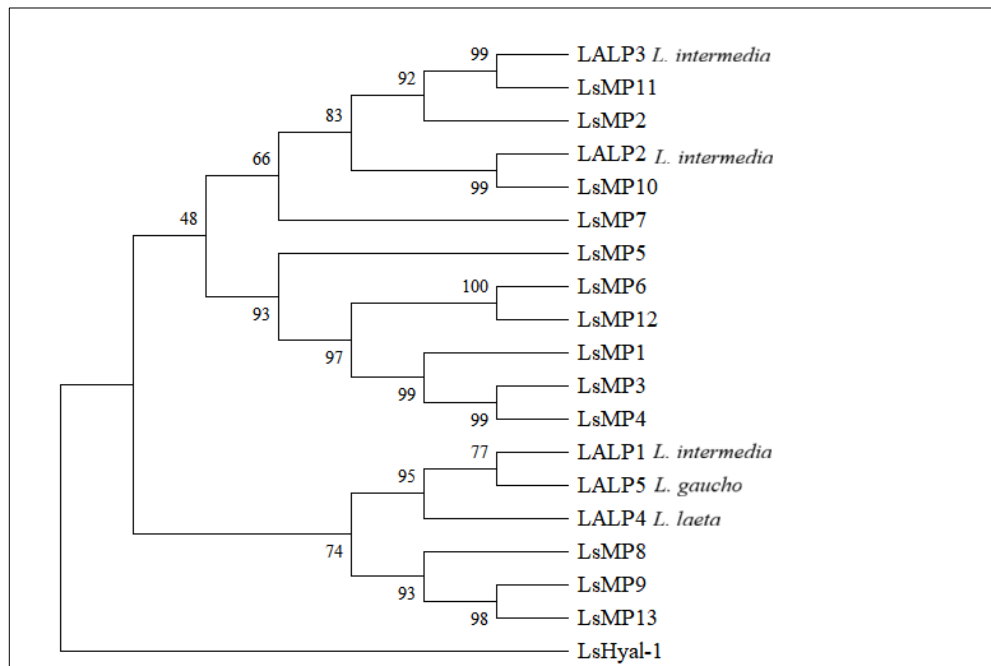
A matriz construída com o propósito de analisar as porcentagens de identidade entre as sequências de LsMPs sugere a existência de classes distintas de metaloproteases (MPs) em *L. similis* (Tabela 15). Observa-se que as sequências LsMP1, LsMP3 e LsMP4 apresentam elevada similaridade entre si, indicando que provavelmente pertencem ao mesmo grupo. De modo análogo, LsMP6 e LsMP12 exibem alto grau de homologia, o que permite inferir que possam constituir uma segunda classe. As demais sequências, embora contenham todos os domínios conservados esperados para MPs, não apresentam porcentagens de identidade suficientes para sustentar sua inclusão em um grupo.

**Tabela 15. Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências pertencentes ao grupo s11 de Loxtox.** A figura foi construída por meio do agrupamento de similaridade utilizando o programa Geneious Prime (versão 2022.2). As porcentagens de identidade entre as sequências estão indicadas na matriz

	LsMP1	LsMP2	LsMP3	LsMP4	LsMP5	LsMP6	LsMP7	LsMP8	LsMP9	LsMP10	LsMP11	LsMP12	LsMP13
LsMP1		47,37	83,33	82,56	53,60	58,13	45,24	40,09	33,66	41,39	44,63	65,88	46,46
LsMP2	47,37		46,12	48,62	47,98	49,30	53,97	39,18	36,63	51,99	55,25	49,77	44,53
LsMP3	83,33	46,12		96,12	58,26	57,92	49,10	33,73	31,55	41,57	42,39	64,79	43,31
LsMP4	82,56	48,62	96,12		52	61,57	46,12	36,56	30,35	42,62	41,80	64,32	43,31
LsMP5	53,60	47,98	58,26	52		59,59	48,80	41,94	41,50	44,14	45,95	64,32	52,52
LsMP6	58,13	49,30	57,92	61,57	59,59		49,78	40,62	37,14	41,89	45,16	96,26	42,75
LsMP7	45,24	53,97	49,10	46,12	48,80	49,78		39,36	34,65	51,17	45,85	50,92	46,04
LsMP8	40,09	39,18	33,73	36,56	41,04	40,62	39,36		45,53	41,89	35,43	41,78	56,72
LsMP9	33,66	36,63	31,55	31,55	41,50	37,14	34,64	45,53		34,50	30,35	38,57	66,41
LsMP10	41,39	52,99	41,57	42,62	44,14	41,89	51,17	41,89	34,50		45,06	44,88	43,70
LsMP11	44,63	55,69	42,39	41,39	45,95	45,16	45,45	35,43	31,55	44,66		45,12	41,27
LsMP12	65,88	49,77	64,79	64,32	64,32	96,26	50,92	41,78	38,57	44,88	46,51		46,46
LsMP13	46,46	44,53	43,31	43,31	52,52	42,75	46,04	56,72	66,41	43,70	41,27	46,46	

A árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo de substituição de aminoácidos JTT, permitiu observar o padrão existente entre as MPs identificadas em *L. similis* e aquelas descritas em *L. intermedia*, *L. gauchoi* e *L. laeta*. O agrupamento das sequências apresentou elevado suporte estatístico, conforme indicado pelos valores de *bootstrap* obtidos a partir de 1000 réplicas, refletindo a confiabilidade das relações inferidas. De forma consistente com a matriz de identidade, as proteínas LsMP1, LsMP3 e LsMP4 formaram um clado bem definido, sugerindo que essas enzimas compartilham um

ancestral comum recente e, possivelmente, funções biológicas semelhantes. De maneira análoga, as sequências LsMP6 e LsMP12 também se agruparam em um mesmo ramo. Por outro lado, LsMP2 e LsMP11 se posicionaram próximas à LALP3, enquanto LsMP10 mostrou maior afinidade com LALP2, o que pode indicar uma conservação de domínios estruturais ou funcionais entre essas proteínas de diferentes espécies (Figura 17).

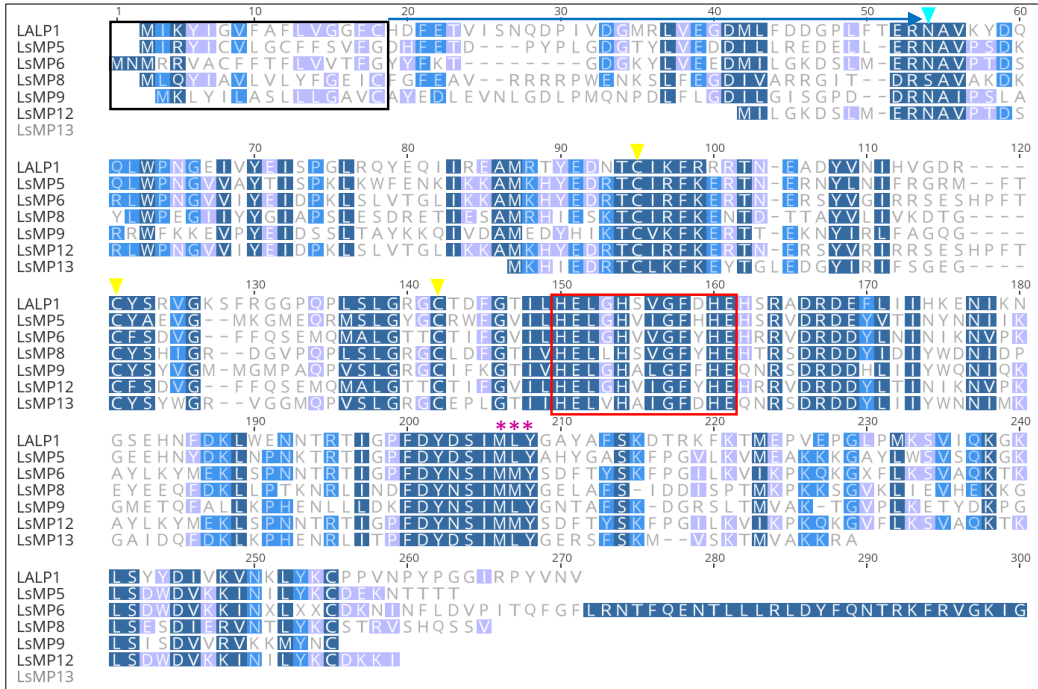


**Figura 17 – Análise evolutiva de metaloproteases de *Loxosceles* pelo método de Máxima Verossimilhança.** A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 12 (Kumar S., *et al* 2016) utilizando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo baseado na matriz JTT (Jones D.T., *et al* 1992). A árvore de consenso *bootstrap* foi inferida a partir de 1000 réplicas (Felsenstein J. 1985). Ramos correspondentes a partições reproduzidas em menos de 50% das réplicas *bootstrap* foram colapsados. O percentual de árvores de réplica nas quais os táxons associados se agruparam no teste de *bootstrap* é apresentado ao lado dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos *Neighbor-Join* e *BioNJ* a uma matriz de distâncias pareadas estimadas com o modelo *JTT*, sendo então selecionada a topologia com o maior valor de log-verossimilhança. Esta análise envolveu 19 sequências de aminoácidos, com um total de 456 posições no conjunto de dados final.

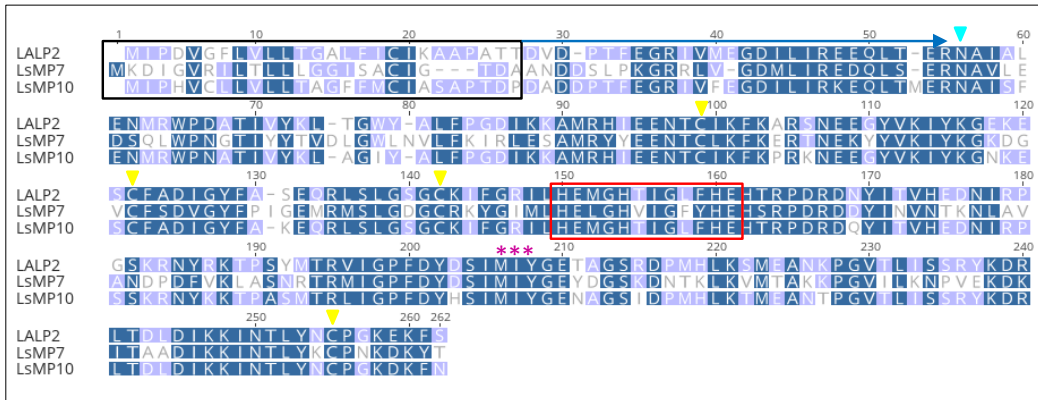
O alinhamento múltiplo das sequências encontradas com sequências do banco de dados demonstrou que as metaloproteases de *L. similis* apresentam alta similaridade com aquelas de *L. intermedia*: LALP1 (Da Silveira *et al.*, 2007), LALP2, e LALP3 (Morgon *et al.*, 2016). Especificamente, LsMP5, LsMP6, LsMP8, LsMP9, LsMP12 e LsMP13 mostraram forte similaridade com LALP1 (Figura 18A), enquanto LsMP10 e LsMP7 agruparam-se mais próximo de LALP2 (Figura 18B). Em contraste, LsMP1, LsMP2, LsMP3, LsMP4 e LsMP11 exibiram maior identidade com LALP3 (Figura 18C). Todas as sequências analisadas demonstraram conservação quanto aos domínios catalíticos esperados para as MPs, bem como

motivos importantes para a estrutura terciária das mesmas, uma vez que foi identificado além do *met-turn* um padrão conservado de cisteínas, essencial para estabilização da estrutura tridimensional da proteína e, conseqüentemente, para a manutenção da função enzimática.

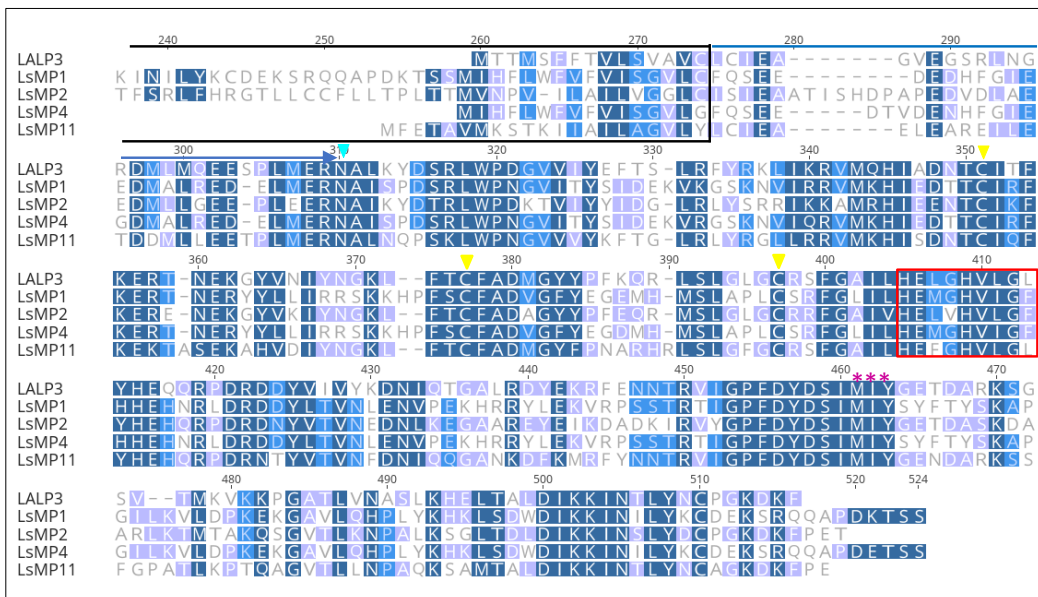
**A**



**B**



**C**



**Figura 18. Alinhamento múltiplo de sequências das LALPs de *L. intermedia* e das novas metaloproteínas de *L. similis*.** Os painéis A, B e C apresentam, respectivamente, os alinhamentos com LALP1, LALP2 e LALP3. O retângulo preto indica a região correspondente ao peptídeo sinal, enquanto a seta azul horizontal (→) destaca o pro-peptídeo. O motivo de ligação ao zinco está realçado em vermelho, e o *met-turn* é assinalado por asteriscos em magenta (\*\*\*)). Resíduos idênticos são mostrados em azul escuro; regiões conservadas entre 80–99% aparecem em azul claro, e aquelas com conservação entre 60–79% em lilás. Aminoácidos não marcados indicam conservação inferior a 60% em relação às sequências das LALPs. O padrão de cisteínas está evidenciado em amarelo (▼), e o primeiro resíduo da proteína madura, previsto pela base Pfam, está indicado em azul ciano (▼).

A primeira evidência da presença de metaloproteases no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* foi relatada por Feitosa L. e colaboradores em 1998. Nesse estudo, foram caracterizadas duas metaloproteases denominadas Loxolisina A (~28 kDa) e Loxolisina B (~32 kDa), que exibiram atividades específicas sobre gelatina, fibronectina e fibrinogênio (Feitosa *et al.*, 1998). Em 2001, proteases foram detectadas no veneno das aranhas marrons, predominantemente metaloproteases dependentes de zinco, sensíveis a EDTA e 1,10-fenantrolina (Da Silveira *et al.*, 2002b); essas proteases também degradam colágeno, fibronectina e fibrinogênio *in vitro*. Os resultados sugerem que essas enzimas são potencialmente responsáveis por parte dos efeitos tóxicos locais observados no loxoscelismo.

Em 2007, Silveira e colaboradores identificaram, clonaram, expressaram e caracterizaram uma metaloprotease tipo astacina do veneno de *L. intermedia* (Da Silveira *et al.*, 2007). Essa enzima, denominada LALP1, apresentou significativa atividade proteolítica, sendo capaz de induzir perda de adesão e lise de células endoteliais, além de promover a degradação de fibronectina, fibrinogênio e gelatina. A análise transcriptômica da glândula de veneno de *L. intermedia* revelou que cerca de 9,8% dos transcritos correspondem a metaloproteases do tipo astacina (Gremski *et al.*, 2010). Perfis proteômicos semelhantes também foram identificados nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*, com evidências indicando a presença de metaloproteases tipo astacina com composições distintas e diferentes níveis de atividade enzimática (Trevisan-Silva *et al.*, 2013). Em estudo conduzido por nosso grupo, um banco de dados derivado da biblioteca de cDNA de *L. laeta* peruana, previamente sequenciado pela plataforma Illumina, foi reanalisado e os dados comparados com sequências disponíveis de toxinas de *Loxosceles*; este levantamento comparativo indicou que aproximadamente 20,72% dos transcritos correspondem a metaloproteases (Medina-Santos *et al.*, 2022).

A sequência da LALP2 de *L. intermedia* foi depositada diretamente no banco de dados, e em 2016, foi realizada a expressão e caracterização da isoforma LALP3 (~24 kDa). A LALP3 compartilha 47–50% de identidade com LALP1 e LALP2 e apresenta similaridade com metaloproteases do tipo astacina de outros artrópodes e nematoides (Morgon *et al.*, 2016). Os

resultados atuais destacam o potencial para avanços na pesquisa sobre metaloproteases derivadas de venenos de aranhas marrons. Além disso, a LALP3 pode ter aplicações promissoras na entrega de fármacos como adjuvante, servindo como estrutura para o desenho racional de novas moléculas, como agonistas ou inibidores, e até mesmo como candidato terapêutico, especialmente em intervenções trombolíticas (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008; Chaim, Trevisan-Silva, *et al.*, 2011).

Em 2019, nove potenciais isoformas de LALPs foram identificadas na análise transcriptômica da glândula de veneno de *L. laeta* do Peru, exibindo variações estruturais significativas de forma similar aos achados para LsMPs de *L. similis*. A diversidade de MPs na composição do veneno, atrelado a características moleculares e funcionais, podem explicar a maior severidade dos casos de loxoscelismo relacionados a *L. laeta* e *L. similis* (Andrade R. M. G. *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2005; Chatzaki *et al.*, 2012; Medina-Santos *et al.*, 2019; Oliveira-Mendes *et al.*, 2020).

Todas essas observações contrastam com os resultados relatados por Foradori e colaboradores, que investigaram se proteases digestivas contribuem para a necrose e concluíram que essas enzimas não atuam com essa capacidade (Foradori *et al.*, 2001). É importante destacar que sua análise focou nas proteases presentes no fluido digestivo regurgitado, que são distintas daquelas contidas no próprio veneno. Portanto, embora metaloproteases provenientes das secreções digestivas possam não induzir diretamente o loxoscelismo, elas ainda podem potencializar os efeitos patológicos do envenenamento por *Loxosceles*. Ademais, toxinas proteolíticas encontradas nos venenos de diversos animais têm sido relatadas quanto ao seu papel significativo nos efeitos nocivos observados após o envenenamento, tais como edema, hemorragia e necrose (Fox & Bjarnason, 1995; Veiga *et al.*, 2001; Luciano *et al.*, 2004; Dantas *et al.*, 2014; Oliveira-Mendes *et al.*, 2020; Silvestre *et al.*, 2005).

Esses achados indicam que, além das toxinas Loxtox, proteases podem contribuir para a dermonecrose e outros efeitos locais do envenenamento por *Loxosceles*, degradando componentes da matriz extracelular. Além disso, a atividade dessas enzimas pode facilitar a difusão de outras toxinas, atuando como fatores de espalhamento. Ressalta-se que as toxinas Loxtox podem promover a ativação indireta de metaloproteases endógenas, mecanismo que possivelmente contribui para os efeitos patológicos observados no loxoscelismo. A liberação de ácido lisofosfatídico (LPA) pela ação catalítica das Loxtox pode estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, as quais atuam na indução e ativação de metaloproteases

envolvidas na degradação tecidual. Isso foi demonstrado por Paixão-Cavalcante e colaboradores, que mostraram que a exposição a Loxtox induz apoptose em queratinócitos humanos, acompanhada de aumento na expressão das metaloproteases MMP-2 e MMP-9 (Paixão-Cavalcante *et al.*, 2006).

Estudos de caracterização utilizando moléculas purificadas ou metaloproteases recombinantes podem fornecer importantes *insights* sobre o papel dessas enzimas no loxoscelismo, especialmente no que se refere às manifestações sistêmicas.

#### 5.3.4 Toxinas Inseticidas

Entre os diversos constituintes químicos presentes nos venenos de aranhas, um grupo relevante apresenta potentes propriedades inseticidas e é principalmente responsável pela paralisia rápida observada nas presas, efeito associado ao bloqueio da transmissão neuromuscular (Parks *et al.*, 1991). Essas moléculas possuem baixo peso molecular (3–8 kDa) e podem agir com especificidade tanto para vertebrados quanto para insetos, interagindo com canais iônicos localizados nas membranas celulares, interferindo assim em processos fisiológicos essenciais (Gomez *et al.*, 2002). Essas toxinas apresentam a estrutura conhecida como *knottins*, também chamadas peptídeos *Inhibitor Cystine Knot* (ICK), caracterizadas por resíduos de cisteína conservados que formam três pontes dissulfeto intramoleculares (C1–C4, C2–C5 e C3–C6) (F. C. Cardoso & Lewis, 2019). Essas pontes dobram a cadeia polipeptídica em um nó globular compacto com quatro laços distintos, que atuam principalmente como sítios de interação com alvos biológicos, como canais iônicos. A arquitetura única confere estabilidade térmica, ácida e proteolítica excepcionais, enquanto a cauda C-terminal estendida contribui para a especificidade e afinidade pelos canais de sódio e outros alvos moleculares (Norton and Pallaghy, 1998; Chaves-Moreira *et al.*, 2017; Matsubara, *et al.*, 2017; Gremski *et al.*, 2021).

A estrutura estável dos peptídeos ICK confere resistência térmica, química e biológica, permitindo que permaneçam estáveis por dias em soro humano e fluidos gástricos (Herzig & King, 2015; Matsubara, *et al.*, 2017). Esses peptídeos atuam principalmente nos canais iônicos regulados por voltagem no sistema nervoso animal, modulando canais de sódio (NaV) e possivelmente de cálcio (CaV) (F. C. Cardoso *et al.*, 2015; L. Zimmermann *et al.*, 2013). Tal atividade induz paralisia flácida e pode levar à morte de insetos, o que torna os *knottins* como

candidatos promissores para o desenvolvimento de bioinseticidas (Zobel-Thropp *et al.*, 2012; Meissner *et al.*, 2016; Chaves-Moreira *et al.*, 2017; Matsubara *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, avanços substanciais na toxilogia de aracnídeos levaram à identificação, purificação e caracterização molecular de um amplo repertório de peptídeos inseticidas presentes nos venenos de aranhas. Esses esforços, apoiados por técnicas de biologia molecular e tecnologias recombinantes, permitiram o sucesso em clonar várias dessas toxinas, ampliando o conhecimento atual sobre sua diversidade estrutural, atividades biológicas e potenciais aplicações (Corzo *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 1995; Penaforte *et al.*, 2000).

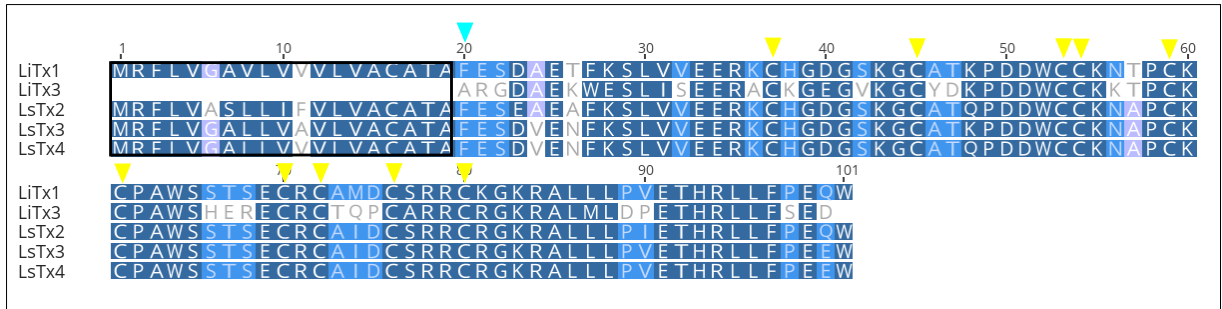
Como parte das contribuições do nosso grupo de pesquisa, toxinas inseticidas foram purificadas a partir do veneno de *L. intermedia*. O veneno apresentou toxicidade acentuada contra várias espécies de Lepidoptera, incluindo *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioides*, *Agrotis ipsilon* e *Diatraea saccharalis*, com valores de DL<sub>50</sub> variando aproximadamente entre 0,9 e 1,9 µg/g. Foram isolados peptídeos inseticidas designados LiTx1, LiTx2 e LiTx3, com massas moleculares aproximadas de 7,4, 7,9 e 5,6 kDa, respectivamente. Sequências parciais de aminoácidos obtidas por degradação de Edman possibilitaram a identificação dos cDNAs correspondentes. Análises preditivas indicaram possíveis modificações pós-traducionais, incluindo N-miristoilação e fosforilação. Comparações de sequências sugeriram que LiTx3 atua em canais de sódio, enquanto LiTx1 e LiTx2 estão mais relacionados a toxinas que atuam em canais de cálcio (de Castro *et al.*, 2004). Complementando esses achados, a análise transcriptômica da glândula de veneno de *L. intermedia* revelou que peptídeos tipo *knottin* da família LiTx são toxinas abundantes, representando grande parte dos transcritos codificadores de toxinas, depois das enzimas Loxtox (toxinas dermonecrotizantes) e metaloproteases do tipo astacina (Gremski *et al.*, 2010b).

Sequências de transcritos com similaridade a toxinas inseticidas foram identificadas pela primeira vez na glândula de veneno de *L. similis* (Tabela 16). Para essa análise, consideraram-se transcritos que exibiam >50% de identidade com sequências de toxinas de aranhas conhecidas depositadas em bancos de dados. As sequências identificadas foram designadas como LsTxN, onde N indica a ordem de descoberta.

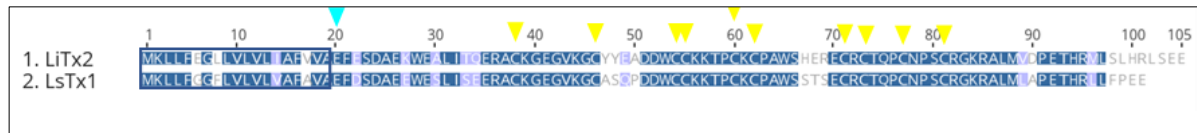
**Tabela 16 – Lista de proteínas putativas do grupo de Toxinas Inseticidas na glândula de veneno de *L. similis*.** O peptídeo sinal previsto pelo SIGNAL IP 6.0 está sublinhado, o primeiro aminoácido da proteína madura destaca-se em azul ciano e as cisteínas estão destacadas em amarelo. A tabela também apresenta os escores de alinhamento obtidos no BLASTp tanto para a sequência primária (P) quanto para a proteína madura (M). Dados de E-value, similaridade, identidade e QC também são indicados.

TOXINAS INSETICIDAS						
TOXINA	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	AFILIAÇÃO	E-VALUE	SIMIL.	ID	QC
LsTx1	MKLLFGGFLVVLVAFVAFAEFDS AEWEWSLI SEERA CKGEGVKG CAS QPDDW CCKKTP CKCPAWSSTSE CR CTQP CNPSCRGKRALMLAPETHRL LFPEE	(P) LiTx2 (Q6B4T4.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>-52</sup>	89%	80.41%	96%
		(M) LiTx3 (Q6B4T3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	1e <sup>-38</sup>	86%	82.28%	96%
LsTx2	MRFLVASLLIFVLVACATAFESEA EAFKSLVVEERKCHGDGSKGCATQ PDDW CCKNAP CKCPAWSSTSE CRC AID CSRRCRGKRALLLP IETHRL FPEQW	(P) LiTx1 (Q6B4T5.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	6e <sup>-52</sup>	96%	88.12%	100%
		(M) LiTx1 (Q6B4T5.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>-49</sup>	97%	91.46%	100%
LsTx3	MRFLVGALLVAVLVACATAFESDV ENFKSLVVEERKCHGDGSKGCATK PDDW CCKNAP CKCPAWSSTSE CRC AID CSRRCRGKRALLLPVETHRL FPEEW	(P) LiTx1 (Q6B4T5.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	5e <sup>-52</sup>	96%	92,08%	100%
		(M) LiTx1 (Q6B4T5.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	3e <sup>-49</sup>	96%	92.68%	100%
LsTx4	MRFLVGALLVVVLVACATAFESDVENF KSLVVEERKCHGDGSKGCATQPDDW CCK KNAP CKCPAWSSTSE CRC AID CSRRC GKRALLLPVETHRLFPPEEW	(P) LiTx1 (Q6B4T5.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	1e <sup>-51</sup>	97%	92.08%	100%
		(M) LiTx1 (Q6B4T5.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	8e <sup>-49</sup>	96%	91.46%	100%
LsTx5	MKSGTFLFAAILVMYVAASGKEEPES IMEQSEERDCIAMFDT CGERAGKGTNC CADSKYPVACRCPAWKGG LCKCNPSCP SSGCNWGR	(P) LiTx3 (Q6B4T3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	8e <sup>-10</sup>	50%	38.55%	93%
		(M) LiTx3 (Q6B4T3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	2e <sup>-05</sup>	53%	43.94%	93%
LsTx6	MRTAIVLIITLFLTHEVLADEGSQSD WSILNKFLDPEQRA CIPRYETCGSNQG KGLN CCGWKYKSKSCPTTWSGDPCK CQPVCPSRGC DWSRP	(P) LiTx3 (Q6B4T3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	4e <sup>-12</sup>	50%	37.89%	99%
		(M) LiTx3 (Q6B4T3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	6e <sup>-08</sup>	56%	48.33%	79%
LsTx7	MKAGLFAFTTFLVVFHAMGE EEE SQVMFQPSYLRVVPRLKSARNAM EGEFENTEQRA C MPSGTK CGKSAG MPTN CCGSWKYK GKCLCATIWSAQ GCK CSLDCPSRGC DHSKP	(P) LiTx3 (Q6B4T3.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	9e <sup>-11</sup>	46%	35.40%	99%
		(M) LiTx2 (Q6B4T4.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	1e <sup>-10</sup>	59%	43.06%	77%

As toxinas LsTx2, LsTx3 e LsTx4 encontradas na glândula de veneno de *L. similis* apresentaram alta similaridade com as toxinas LiTx1 (Q6B4T5.1) e LiTx3 (Q6B4T3.1) de *L. intermedia* (Figura 19), enquanto a sequência LsTx1 mostrou maior similaridade com LiTx2 (Q6B4T4.1) (Figura 20).



**Figura 19 - Alinhamento de LsTx2, LsTx3 e LsTx4 de *L. similis* com LiTx1 e LiTx3 de *L. intermedia*.** Resíduos idênticos são mostrados em azul escuro; regiões conservadas entre 80–99% aparecem em azul claro, e aquelas com conservação entre 60–79% em lilás. Aminoácidos não marcados indicam conservação inferior a 60% em relação às sequências de LiTx. O padrão de cisteínas está evidenciado em amarelo (▼), e o primeiro resíduo da proteína madura, está indicado em azul ciano (▼). O peptídeo sinal previsto pelo Signal IP 6.0 está indicado no retângulo preto.

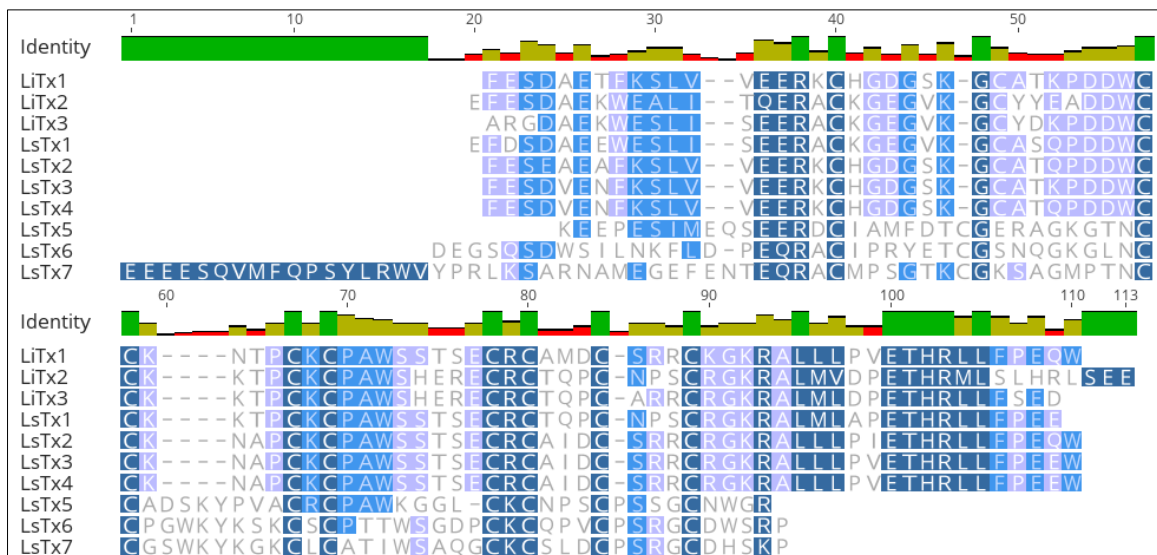


**Figura 20 - Alinhamento de LsTx1 *L. similis* com LiTx2 de *L. intermedia*.** Resíduos idênticos são mostrados em azul escuro; regiões conservadas entre 80–99% aparecem em azul claro, e aquelas com conservação entre 60–79% em lilás. Aminoácidos não marcados indicam conservação inferior a 60% em relação às sequências de LiTx. O padrão de cisteínas está evidenciado em amarelo (▼), e o primeiro resíduo da proteína madura, está indicado em azul ciano (▼). O peptídeo sinal previsto pelo Signal IP 6.0 está indicado no retângulo preto.

Por fim, apesar de LsTx5, LsTx6 e LsTx7 exibirem resíduos menos conservados em comparação às outras sequências analisadas, mantiveram o padrão característico de cisteína observado em todas as sequências (Tabela 17). Essa conservação das cisteínas, confirmada pelo alinhamento múltiplo das sequências maduras no Geneious Prime 2022.2, é crítica, pois mantém a estrutura de pontes dissulfeto que formam o nó característico, essencial para a estabilidade estrutural e atividade inseticida dessas toxinas. Além das cisteínas, alguns um trecho se destaca por sua conservação em todas as sequências: ETHRXL, correspondentes aos resíduos 100-105, numerados de acordo com LiTx1 (Figura 21).

**Tabela 17. Matriz deduzida a partir do alinhamento das sequências LsTx com toxinas inseticidas de *L. intermedia*.** A figura foi construída por meio do agrupamento de similaridade utilizando o programa Geneious Prime (versão 2022.2). As porcentagens de identidade entre as sequências estão indicadas na matriz.

	LiTx1	LiTx2	LiTx3	LsTx1	LsTx2	LsTx3	LsTx4	LsTx5	LsTx6	LsTx7
LiTx1		59,74	67,95	70,37	88,12	92,08	92,08	-	-	30,19
LiTx2	55,67		84,00	80,41	54,64	55,67	55,67	31,11	-	-
LiTx3	67,09	84,00		82,28	64,56	65,82	64,56	28,57	-	-
LsTx1	67,33	80,41	82,28		65,35	67,33	68,32	33,72	25,53	32,20
LsTx2	88,12	54,64	64,56	65,35		90,10	91,09	29,76	-	30,14
LsTx3	92,08	55,67	65,82	67,33	90,10		98,02	-	-	29,17
LsTx4	92,08	58,44	64,56	71,60	91,09	98,02		-	-	30,88
LsTx5	29,76	31,11	-	33,72	29,76	28,57	29,76		40,00	34,23
LsTx6	-	-	-	25,53	-	-	-	40,00		35,96
LsTx7	30,19	-	-	32,20	30,14	29,17	30,14	34,23	37,96	



**Figura 21 - Alinhamento múltiplo das sequências maduras de LsTx e LiTx.** Resíduos idênticos são mostrados em azul escuro; regiões conservadas entre 80–99% aparecem em azul claro, e aquelas com conservação entre 60–79% em lilás. Aminoácidos não marcados indicam conservação inferior a 60% em relação às sequências de LiTx. O gráfico de identidade inferido pelo Geneious Prime 2022.2 destaca regiões idênticas em verde, resíduos relativamente conservados em bege e pouca conservação em vermelho.

Em 2013, um novo peptídeo do tipo ICK da glândula de veneno de *L. intermedia* foi clonado, expresso de forma heteróloga e caracterizado imunologicamente. Esse peptídeo, denominado U2-SCRTX-Li1b, apresentou alta similaridade de sequência (86%) com LiTx3 e demonstrou potencial imunogênico. Ensaio de *immunoblotting* revelaram a presença de epítopos semelhantes a U2-SCRTX-Li1b no veneno bruto de *L. intermedia*, quando testados com soro hiper-imune contra o peptídeo recombinante (Matsubara *et al.*, 2013). Posteriormente, em 2016, o mesmo grupo de pesquisa relatou por meio de análise bioinformática que o peptídeo

recombinante exibiu forte conservação dos resíduos de cisteína e similaridade estrutural com a neurotoxina  $\mu$ -hexatoxina-Mg2a, um conhecido inibidor de canais de sódio em insetos presente no veneno de *L. intermedia* (Meissner *et al.*, 2016). Além disso, a atividade inseticida de U2-SCRTX-Li1b foi avaliada, demonstrando sua capacidade de induzir paralisia flácida irreversível em moscas varejeiras (*Lucilia cuprina*). A sequência de cDNA também revelou a presença de peptídeos ortólogos do tipo *knottin* nos venenos de *L. gaucho* e *L. laeta* (Matsubara, *et al.*, 2017)

A identificação de peptídeos *knottin* inseticidas na glândula de veneno de *L. similis*, que exibem forte similaridade com aqueles descritos em *L. intermedia*, destaca a conservação evolutiva dessas toxinas entre as aranhas marrons. Além do papel ecológico, os peptídeos *knottin* possuem notável potencial biotecnológico como bioinseticidas seletivos e ambientalmente sustentáveis, oferecendo alternativas promissoras aos pesticidas químicos convencionais. Estudos prévios demonstraram que os *knottins* de *L. intermedia* atuam em canais NaV de insetos, fornecendo importantes insights sobre os mecanismos moleculares dessas toxinas e reforçando sua aplicação como biopesticidas seletivos. Além do potencial agroquímico, peptídeos inseticidas dos venenos de *Loxosceles* podem servir como poderosas ferramentas na pesquisa biomédica, com possíveis aplicações no estudo da citotoxicidade, processos inflamatórios, respostas endoteliais e integridade vascular. Ressalta-se que a possibilidade dessas toxinas atuarem em canais iônicos de mamíferos existe, mas ainda são necessários estudos para confirmação e detalhamento.

### 5.3.5 Hialuronidases

Por fim, uma sequência putativa de hialuronidase foi detectada (LsHyal-1), apresentando 87,94% de similaridade com uma sequência de hialuronidase do veneno de *L. intermedia* (R4J7Z9.1), denominada LiHyal-1 (Tabela 18). A presença de hialuronidases em venenos de *Loxosceles* foi demonstrada pela primeira vez em um estudo publicado (Wright *et al.*, 1973), que reportou atividade de hialuronidase no veneno de *L. reclusa*. Essa classe de proteínas também foi identificada nos venenos de *L. rufescens* (Young & Pincus, 2001), *L. laeta* (Medina-Santos *et al.*, 2022), e outras espécies, sugerindo uma conservação evolutiva que destaca a importância dessas enzimas no processo de envenenamento causado por aranhas do gênero *Loxosceles*.

**Tabela 18 – Sequência putativa de hialuronidase encontrada na glândula de veneno de *L. similis*.** O peptídeo sinal previsto pelo SIGNAL IP 6.0 está sublinhado, o primeiro aminoácido da proteína madura destaca-se em azul ciano e as cisteínas estão destacadas em amarelo. A tabela também apresenta os escores de alinhamento obtidos no BLASTp tanto para a sequência primária (P) quanto para a proteína madura (M). Dados de *E-value*, similaridade, identidade e QC também são indicados. Os possíveis sítios para N-glicosilação estão destacados em caixa roxa e resíduos importantes para a função catalítica em caixa preta (parâmetros das ferramentas Expasy).

HIALURONIDASE						
TOXINA	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	AFILIAÇÃO	E-VALUE	SIMIL.	ID	QC
Ls_Hyal-1	MNAVFVLAISLSAWSLAVGFDVYWNVPSQQCKKYG MNFVPLLEKYSILVNEDDNFKGDKITIFYEAQLGL YPLIGAKEESINGGIPQLGDLKAHLEKAANDIRRD IPDKSATGLRIIDWEAWRPTWEE <sup>NWS</sup> PLHKYQDWM KKVARQFNPAARESTIVKLAQTEWENSAKSWMLST LQLGKQLRPNSVWCYLLFPDCYNYKGNVQDFQCS EAIRRGNDKLLKWLWEESTAVCPSTIYIKEGQLT <sup>NYT</sup> AQQRIWFTNGRLQEALRVAQPKARIYPYI <sup>NYS</sup> IKP GMMVPEA <sup>E</sup> FWRLMAQIGSLGMDGAVIWGSSASVGS KSHCAQLLKYIAEVLGPATLRIKENFARCSKQACS GRGRCTWPKDTSVIAWKFLVEKEDYDFYLGDI <sup>E</sup> CK CTEGYEGRYCEK <sup>L</sup> SDKNRSNDELHL	(P) Hialuronidase /Condroitinas e (R4J7Z9.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	0.0	92%	87.94%	96%
	(M) Hialuronidase /Condroitinas e (R4J7Z9.1) <i>Loxosceles intermedia</i>	0.0	94%	89.42%	96%	

Hialuronidasas são enzimas capazes de degradar glicosaminoglicanos como ácido hialurônico e condroitina sulfato, aumentando a permeabilidade tecidual no local do envenenamento e promovendo a difusão do veneno através da matriz extracelular. O estudo de Wright e colaboradores (Wright *et al.*, 1973) demonstrou a presença de hialuronidase em *L. reclusa* utilizando um ensaio turbidimétrico, que mede a diminuição da turbidez de uma solução de ácido hialurônico após a degradação enzimática. A atividade foi quantificada comparando a redução da absorbância a 600 nm ao longo do tempo na presença do veneno. Posteriormente, isoformas foram encontradas nos venenos de *L. rufescens*, *L. laeta* e *L. intermedia*, com massas moleculares entre 41 e 43 kDa (Ferrer *et al.*, 2013; Young & Pincus, 2001). A expressão e caracterização funcional baseada em biblioteca de cDNA de uma hialuronidase da glândula de veneno de *L. intermedia* foi abordada no trabalho de Ferrer e colaboradores, cujos resultados reforçam sua importância na ocorrência e agravamento de eritema, equimose e lesões dermonecroticas (Ferrer *et al.*, 2013).

A potencialização da ação letal dos venenos pela enzima hialuronidase é observada em outros venenos, como demonstrado por Oliveira-Mendes e colaboradores com o veneno do escorpião *T. serrulatus* (de Oliveira-Mendes *et al.*, 2019). O estudo demonstra que a hialuronidase do veneno de *T. serrulatus* (TsV) atua como um fator essencial para a disseminação do veneno no organismo da vítima. A neutralização dessa enzima com soro anti-hialuronidase retardou em aproximadamente 190 minutos (em relação ao controle) a

distribuição do veneno da região da picada para a corrente sanguínea, bem como sua chegada aos órgãos-alvo, como coração, fígado, pulmões, baço e tireoide. Observou-se, ainda, concentração aumentada do veneno neutralizado no sangue, sugerindo que a hialuronidase também facilita a passagem do veneno da circulação para os tecidos. Esses dados sugerem que a hialuronidase promove tanto a dispersão inicial do veneno quanto sua distribuição sistêmica, contribuindo para a rápida ação tóxica do TsV. Os resultados apontam para o potencial uso da inibição da hialuronidase como uma estratégia terapêutica inicial para retardar a disseminação do veneno e melhorar o manejo clínico do envenenamento por *T. serrulatus*.

A análise estrutural das hialuronidases revela uma organização altamente conservada entre diferentes táxons, incluindo aracnídeos, mamíferos e insetos. A isoforma de hialuronidase encontrada na glândula de veneno de *L. similis* (LsHyal-1) apresentou uma arquitetura típica, com um domínio catalítico N-terminal proeminente e um domínio tipo EGF C-terminal, consistente com os padrões previamente descritos para outras hialuronidases animais (Kreil, 1995; Stern & Jedrzejas, 2006; Ferrer *et al.*, 2013; Gremski, Matsubara, da Justa, *et al.*, 2021; Guerra-Duarte *et al.*, 2019; De-Bona *et al.*, 2021). No sítio catalítico, foram identificados dois resíduos ácidos invariantes, ácido aspártico (D<sup>129</sup>) na sequência madura e ácido glutâmico (E<sup>131</sup>), em posições análogas às encontradas em hialuronidases de outros aracnídeos. Esses resíduos são fundamentais para a catálise e reconhecimento do substrato, e sua conservação confirma sua importância evolutiva e funcional (Chao *et al.*, 2007; Ferrer *et al.*, 2013). Resíduos aromáticos, como tirosina (Y) e fenilalanina (F), essenciais para a interação com o substrato açúcar, também foram encontrados em posições estruturalmente análogas em LsHyal-1 e outras espécies, reforçando a noção de conservação funcional (Ceroni *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2012). O alinhamento múltiplo de sequências demonstrou um alto grau de similaridade total entre LsHyal-1 e as hialuronidases de outros aracnídeos, especialmente no que diz respeito ao motivo catalítico e aos resíduos aromáticos de ligação ao açúcar (Figura 22).



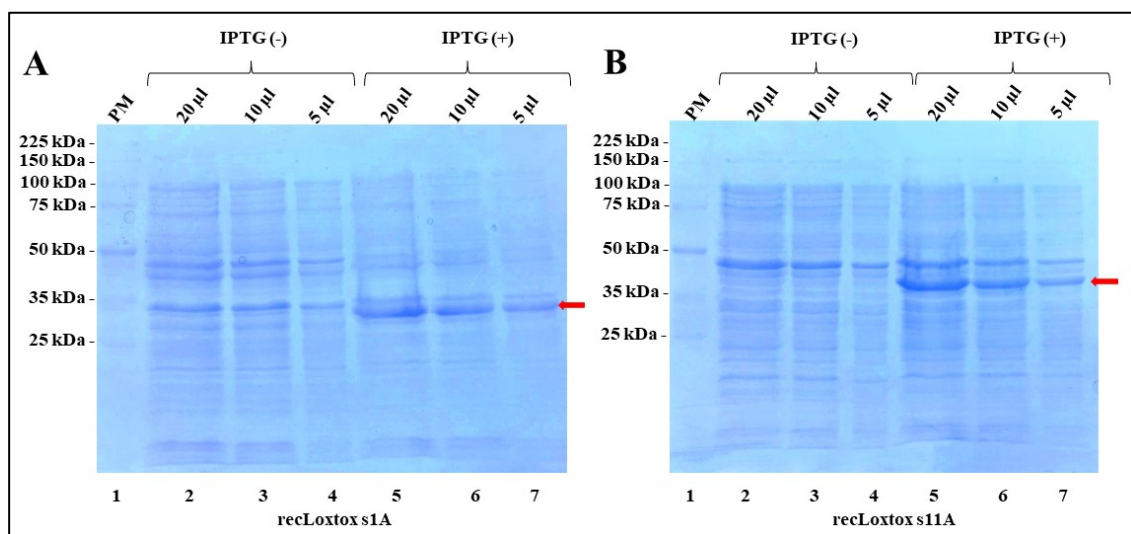
Os alinhamentos de sequência demonstraram um alto grau de identidade entre a isoforma recentemente identificada, LsHyal-1, e a LiHyal-1 de *L. intermedia*, reforçando a noção de conservação evolutiva dentro do gênero. A LiHyal-1 foi expressa com sucesso como uma proteína recombinante em um sistema eucariótico, resultando em uma molécula N-glicosilada que manteve plena atividade enzimática sobre o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina, componentes majoritários da matriz extracelular. Ensaio funcionais demonstraram que a LiHyal-1 recombinante não apenas hidrolisa esses glicosaminoglicanos, mas também atua como um potente fator de difusão, potencializando de forma marcante os efeitos dermonecróticos e edematogênicos induzidos pela Loxtox recombinante *in vivo*, reproduzindo assim o perfil patológico das toxinas nativas. As análises imunológicas confirmaram ainda a conservação de epítomos, evidenciada por uma forte reatividade cruzada com antisoro, destacando a relevância biológica dessas enzimas para a compreensão do loxoscelismo e para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas (Ferrer *et al.*, 2013; De-Bona *et al.*, 2021).

Além de sua importância no loxoscelismo, o estudo das hialuronidases tem revelado abordagens promissoras para aplicações biotecnológicas. A hialuronidase recombinante pode ser utilizada na reprodução assistida, particularmente em protocolos de fertilização *in vitro* (FIV), facilitando a remoção do cúmulo oóforo (massa de células do cúmulo que circunda o oócito) e, assim, aumentando a penetração espermática e a eficiência da fertilização (Kreil, 1995). Por outro lado, inibidores de hialuronidase têm demonstrado potencial como contraceptivos não hormonais, ao evitar a degradação enzimática da matriz que envolve o oócito. Esses inibidores também vêm sendo explorados quanto às suas propriedades antitumorais, já que diversos tipos de câncer utilizam a atividade da hialuronidase para invadir tecidos adjacentes e promover metástases (Harui & Roth, 2022). De forma semelhante, por secretarem hialuronidase como fator de virulência para facilitar a invasão tecidual, certas bactérias podem ser alvo de estratégias antibacterianas baseadas na inibição dessa enzima (Botzki *et al.*, 2004). Além disso, no contexto do envenenamento, hialuronidases presentes em venenos animais atuam como fatores de difusão, favorecendo a dispersão de toxinas. Portanto, inibidores específicos podem contribuir para o desenvolvimento de terapias adjuvantes voltadas a limitar a disseminação sistêmica dos componentes do veneno (Ferrer *et al.*, 2013; Girish & Kemparaju, 2007; Gremski, Matsubara, da Justa, *et al.*, 2021; More *et al.*, 2022; Zeeshan Bhatti & Karim, 2021).

#### 5.4 Expressão e Purificação de *recLoxtox s1A* e *recLoxtox s11A*

A indução da expressão das proteínas recombinantes *recLoxtox s1A* e *recLoxtox s11A* mostrou-se bem-sucedida após 4 horas de incubação, conforme evidenciado pela análise em gel de SDS-PAGE a 12%. Foram observadas bandas de aproximadamente 35 kDa, correspondendo aos pesos moleculares previstos para as proteínas recombinantes *recLoxtox s1A* (34,2 kDa) e *recLoxtox s11A* (34,9 kDa). A Figura 23 apresenta os perfis de expressão obtidos, sendo A referente à *recLoxtox s1A* e B à *recLoxtox s11A*.

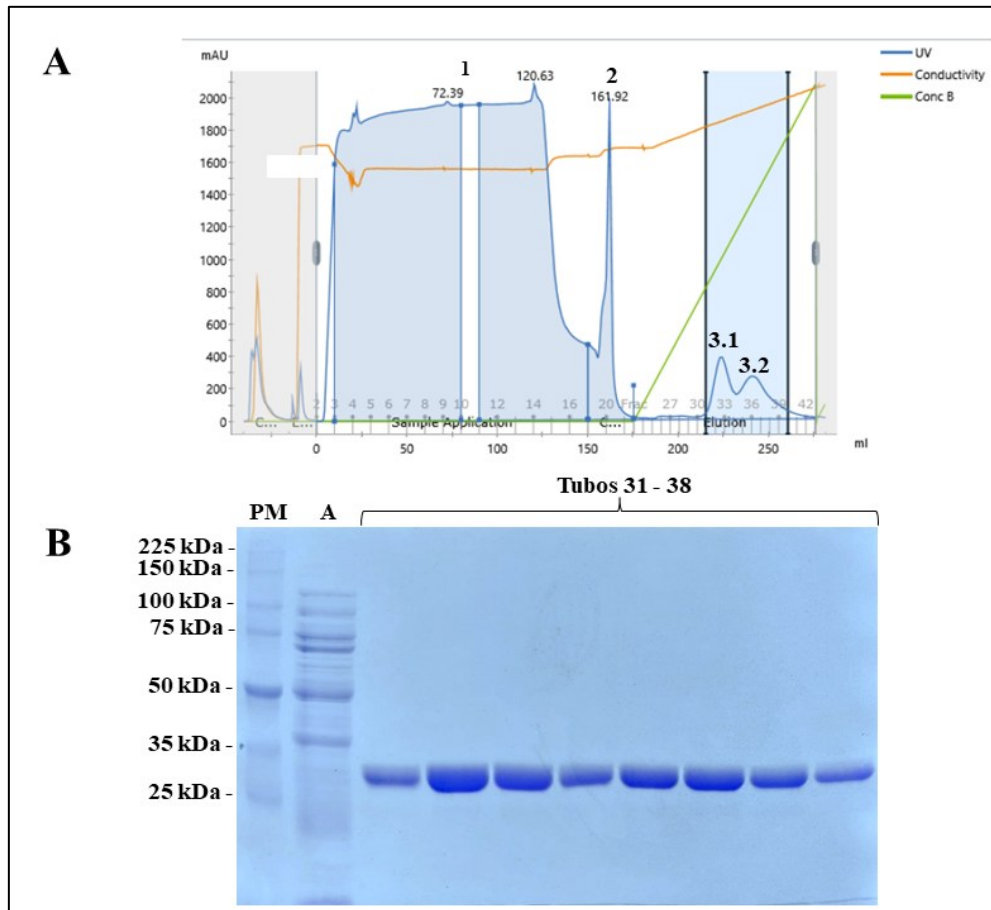
Para ambas as proteínas, foram aplicados diferentes volumes de amostra (20  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 5  $\mu$ L) dos extratos celulares induzidos com IPTG, além das respectivas amostras controle (sem indução). A presença de bandas intensas nas amostras induzidas, ausentes nos controles, confirmou a expressão específica das proteínas recombinantes. Esses resultados indicam que as condições de indução utilizadas foram adequadas para promover a expressão eficiente das toxinas recombinantes.



**Figura 23.** Análise em gel de SDS-PAGE 12% do produto de expressão das proteínas recombinantes *recLoxtox s1A* e *recLoxtox s11A* -*recLoxtox s1A* (A) e *recLoxtox s11A* (B) em *E. coli* após indução com IPTG. A primeira canaleta (PM) corresponde ao padrão de peso molecular, cujos valores esperados estão indicados à esquerda. As canaletas 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, à aplicação de 20, 10 e 5  $\mu$ L do extrato celular não induzido (sem adição de IPTG), enquanto as canaletas 5, 6 e 7 correspondem aos mesmos volumes de amostra após 4 horas de indução com IPTG. A seta vermelha indica a banda correspondente à proteína recombinante expressa.

Durante o processo de purificação, a eluição da proteína recombinante *recLoxtox s1A* ocorreu em uma faixa de 39% a 84% de concentração de imidazol (195–420 mM), resultando na formação de dois picos principais de eluição: Pico 1 (tubos 31 a 34) e Pico 2 (tubos 35 a 39) (Figura 24A). Para verificar se ambos os picos correspondiam à proteína de interesse, as frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 12% antes da formação do pool (Figura 24B). A

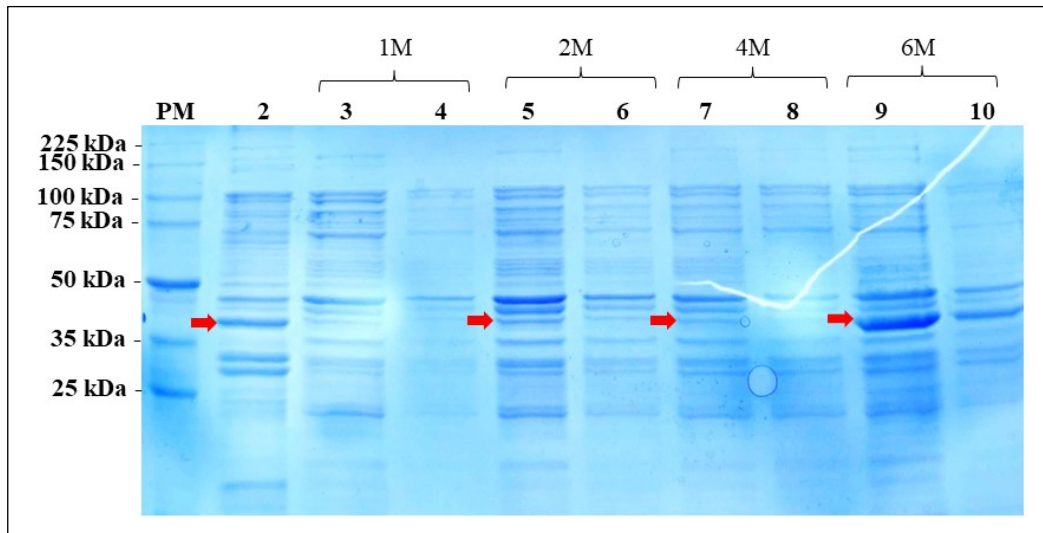
análise revelou a presença da banda correspondente à recLoxtox s1A em ambas as frações, confirmando a pureza e homogeneidade do material obtido. Assim, os tubos referentes aos picos 3.1 e 3.2 (31 a 39) foram reunidos para compor o *pool* final da proteína purificada. O rendimento da purificação após a diálise foi de 26 mL da proteína recombinante a uma concentração de 0,97 mg/mL.



**Figura 24. Purificação da proteína recombinante recLoxtox s1A.** (A) Perfil cromatográfico da purificação de recLoxtox s1A. A amostra foi aplicada em uma coluna HisTrap HP 5 mL (Cytiva). O Pico 1 corresponde ao efluente obtido durante a aplicação da amostra; Pico 2 é a fração correspondente às proteínas não ligadas (*wash*). Picos 3.1 e 3.2 correspondem às frações eluídas entre 39–84% de imidazol, equivalentes a 195–420 mM, nas quais foi recuperada a recLoxtox s1A. (B) Análise em SDS-PAGE 12% das frações obtidas na purificação. A primeira canaleta (PM) corresponde ao padrão de peso molecular, com valores indicados à esquerda. A canaleta A representa a amostra aplicada na coluna HisTrap, e as canaletas subsequentes correspondem aos tubos 31 a 38 (10  $\mu$ L de cada fração).

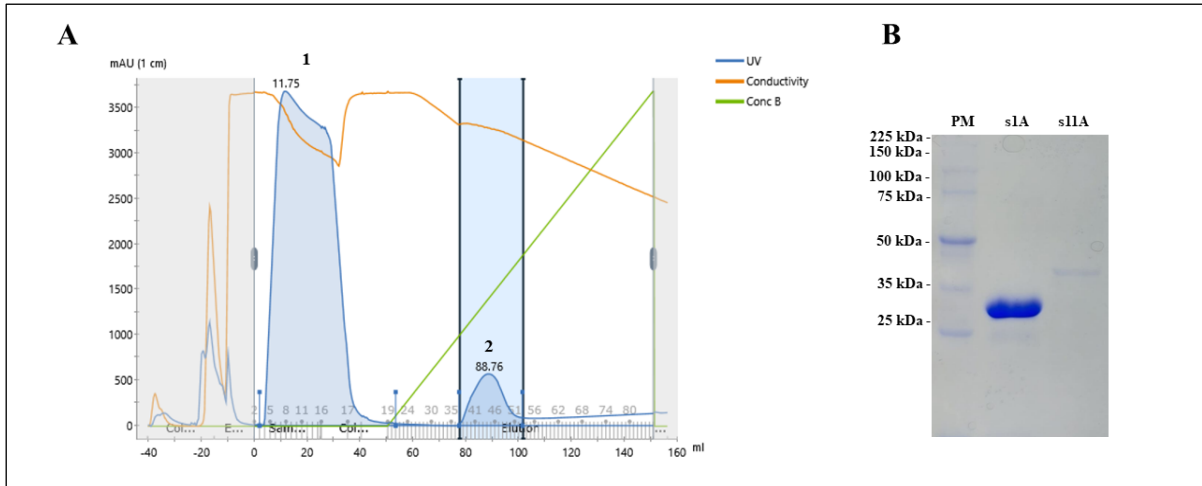
Como a proteína recombinante recLoxtox s1A foi expressa predominantemente na forma de corpos de inclusão, a fração insolúvel necessitou ser submetida a um processo de solubilização em tampão de ligação contendo uréia 6 M. Para determinar a concentração ideal de agente desnaturante, foram testadas diferentes condições de solubilização (1, 2, 4 e 6 M de uréia). A Figura 25 apresenta o gel de SDS-PAGE 12% referente a esse ensaio, no qual se

observa que a solubilização com 6 M de uréia resultou na recuperação mais eficiente da proteína recombinante, evidenciada pela maior intensidade da banda correspondente à recLoxtox s11A.



**Figura 25. Teste de solubilização da proteína recombinante recLoxtox s11A proveniente da fração insolúvel.** A amostra foi submetida à solubilização em tampão de ligação contendo diferentes concentrações de ureia (1–6 M) em volumes variáveis (0,5 mL e 1 mL). A primeira canaleta (PM) corresponde ao padrão de peso molecular, com valores indicados à esquerda. A canaleta 2 representa a fração insolúvel (*pellet*). As canaletas 3 e 4 correspondem à solubilização da amostra em 1 M de ureia, com aplicação de 20  $\mu$ L e 10  $\mu$ L, respectivamente. O mesmo padrão se repete nas canaletas 5 e 6 para 2 M, nas canaletas 7 e 8 para 4 M, e nas canaletas 9 e 10 para 6 M de ureia. As setas vermelhas indicam a banda correspondente à recLoxtox s11A, observada na canaleta 2 como fração insolúvel e nas canaletas 5, 7 e 9 como proteína recombinante solubilizada após tratamento com 0,5 mL das diferentes concentrações de ureia.

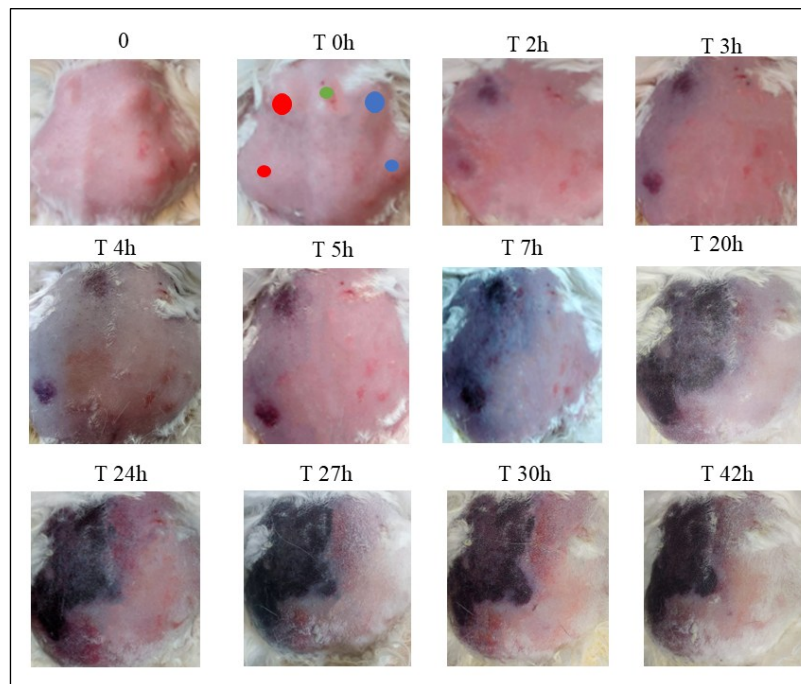
A purificação da proteína recombinante recLoxtox s11A foi realizada utilizando tampões de ligação e eluição contendo 6 M de ureia, uma vez que a proteína foi expressa predominantemente na forma insolúvel. O perfil cromatográfico obtido (Figura 26A) apresentou dois picos principais: o primeiro, correspondente ao efluente coletado durante a aplicação da amostra e às proteínas não ligadas à matriz de afinidade. O segundo pico corresponde à recLoxtox s11A eluída, entre 27% e 51% de imidazol, correspondendo a concentrações de 135 a 255 mM, ainda em presença de 6 M de uréia. A análise das frações eluídas por SDS-PAGE 12% (Figura 26B) revelou uma banda próxima a 35 kDa, compatível com o peso molecular previsto para a recLoxtox s11A (34,9 kDa), confirmando o sucesso da purificação sob condições desnaturantes, embora em menor concentração quando comparada à recLoxtox s1A. O rendimento da purificação após a diálise foi de 10 mL da proteína recombinante a uma concentração de 0,20 mg/mL.



**Figura 26. Purificação da proteína recombinante recLoxtox s11A.** (A) Perfil cromatográfico da purificação de recLoxtox s11A. A amostra solubilizada proveniente da fração insolúvel foi aplicada em uma coluna HisTrap HP 5 mL (Cytiva) sob condições desnaturantes (6 M de ureia). O pico 1 corresponde ao efluente obtido durante a aplicação da amostra e a fração correspondente às proteínas não ligadas (lavagem). A recLoxtox s11A foi eluída no Pico 2, entre 27% e 51% de imidazol, equivalentes a 135–255 mM, na presença de 6 M de ureia. (B) SDS-PAGE 12% das proteínas recLoxtox s1A e recLoxtox s11A após diálise em tampões com concentrações decrescentes de uréia (4 M, 2 M, 1 M e 0 M).

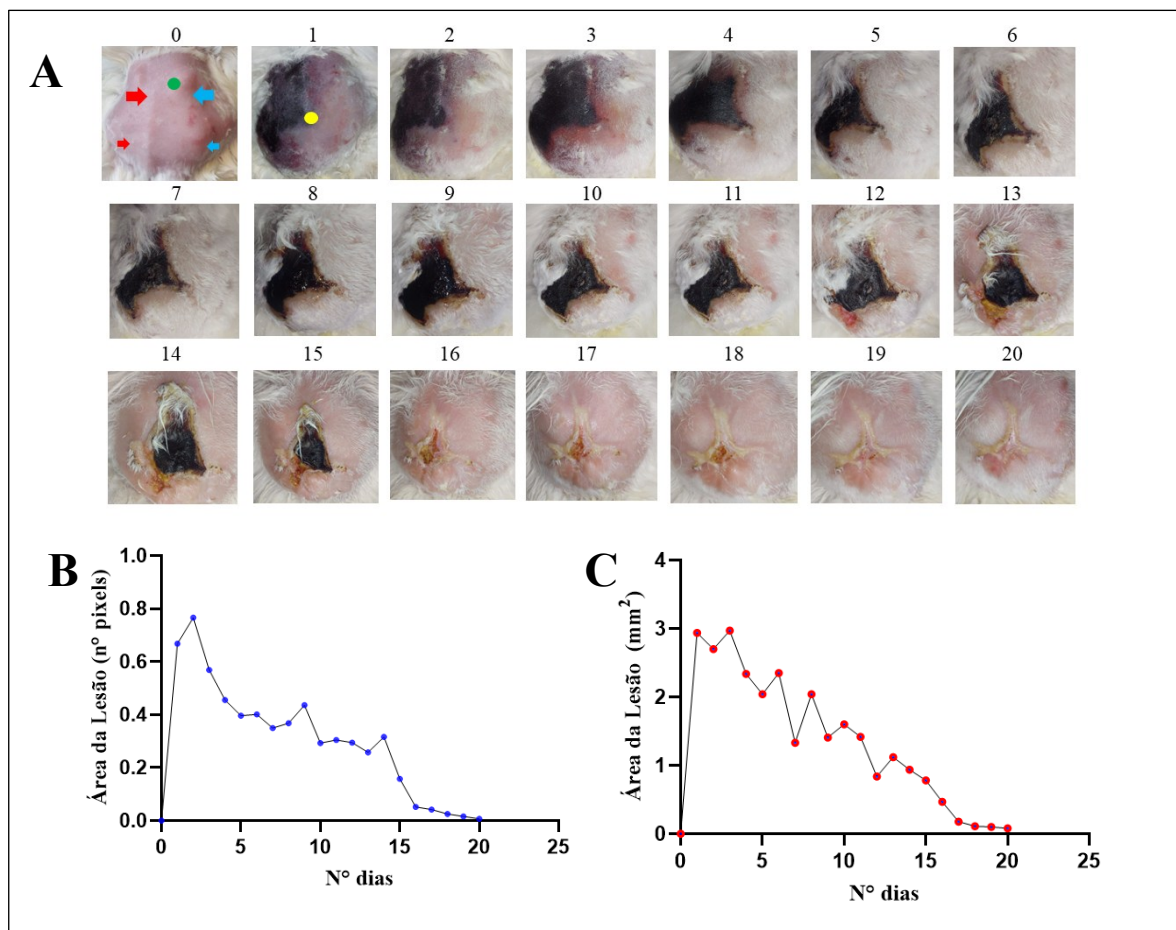
### 5.5 Efeitos cutâneos de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em coelho

O efeito cutâneo das recombinantes foi realizado com o objetivo de testar a atividade fuinccional das mesmas. A Figura 27 apresenta o desenvolvimento das lesões cutâneas observadas ao longo de 42 horas após a aplicação intradérmica das toxinas recombinantes. No tempo inicial (T0h), imediatamente após as injeções, é possível visualizar os locais exatos de aplicação, indicados por círculos coloridos: vermelho (recLoxtox s1A), azul (recLoxtox s11A) e verde (controle com solução salina). Os círculos maiores correspondem à dose de 5 µg e os menores à de 2,5 µg. Após 2 horas, observou-se o surgimento de edema e eritema nos locais de aplicação de recLoxtox s1A, indicando o início da formação da lesão. Até aproximadamente 5 horas, essas alterações tornaram-se mais evidentes para ambas as doses de recLoxtox s1A, enquanto a recLoxtox s11A não apresentou lesões significativas no mesmo período. Por volta de 7 horas, as lesões provocadas por recLoxtox s1A exibiam expansão acentuada, acompanhada de sinais iniciais de necrose tecidual. Após 20 horas, já não se observava distinção clara entre os pontos de aplicação correspondentes à toxina recLoxtox s1A. A lesão provocada pela recLoxtox s1A continuou a se expandir até 42 horas, quando sua progressão cessou e iniciou-se a formação de uma crosta sobre a área necrosada, enquanto nenhum efeito significativo foi observado para as doses de recLoxtox s11A.



**Figura 27 - Evolução temporal das lesões cutâneas induzidas por injeções intradérmicas das toxinas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em coelho.** Os círculos indicam os locais de aplicação: vermelho (recLoxtox s1A), azul (recLoxtox s11A) e verde (controle com solução salina). Círculos maiores correspondem à dose de 5 µg e os menores à de 2,5 µg. O tempo em que cada imagem foi tirada é indicada acima de cada figura.

A evolução da lesão foi monitorada diariamente ao longo de 20 dias. (Figura 28A) A Figura 28A ilustra a progressão morfológica da lesão durante esse período. A área da lesão foi determinada com base nas medidas dos diâmetros maior (D) e menor (d), que correspondem à maior e menor extensão na área da lesão, respectivamente aplicando-se a fórmula da área de uma elipse:  $A \text{ (mm}^2\text{)} = \pi \times D \times d / 4$  (Figura 28B) (Mehl *et al.*, 2020). Além disso, a área também foi quantificada utilizando o software ImageJ, por meio da contagem de pixels correspondentes à região lesionada (Figura 28C). A análise dos gráficos e das imagens revela que a lesão se estabelece de forma rápida, seguida por uma diminuição gradual de sua área, mais evidente a partir do décimo dia de observação. É importante destacar que, cerca de 20 horas após a administração das proteínas recombinantes, não foi mais possível distinguir os efeitos correspondentes às doses de 2,5 e 5,0 µg, uma vez que as lesões se coalesceram em uma única área. Ademais, o desequilíbrio imunológico desencadeado por ambas as doses parece exercer um efeito sinérgico, intensificando as manifestações locais.

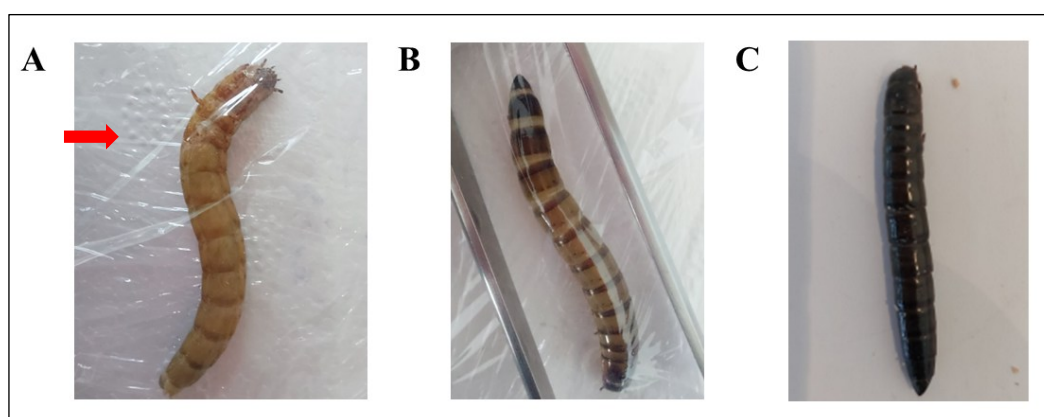


**Figura 28 - Evolução diária da lesão cutânea induzida em coelho.** (A) Progressão morfológica da lesão ao longo de 20 dias de acompanhamento. (B) Quantificação da área da lesão pelo software ImageJ, a partir da contagem de pixels correspondentes à região afetada. (C) Cálculo da área da lesão com base nos diâmetros maior (D) e menor (d), utilizando a fórmula da área de uma elipse ( $A \text{ (mm}^2\text{)} = \pi \times D \times d / 4$ ). Observa-se que a lesão se forma rapidamente nos primeiros dias e apresenta redução progressiva de área, mais acentuada após o décimo dia de observação. As setas indicam a área de injeção de recLoxtox s1A (vermelhas) recLoxtox s11A (azuis). As setas maiores correspondem à dose de 5  $\mu\text{g}$  e os menores à de 2,5  $\mu\text{g}$ . O círculo verde indica a região de injeção de salina enquanto o círculo amarelo destaca a lesão estabelecida no dia 1.

### 5.6 Ensaio de toxicidade recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em insetos (larvas de *Tenebrio molitor*) (Resultados preliminares)

Os resultados apresentados nesta seção e nas que se seguem são preliminares, refletindo o andamento parcial das análises previstas no projeto de doutorado. Isso se deve a atrasos decorrentes do tempo necessário para obtenção das autorizações formais exigidas para a execução de outros protocolos previamente delineados. Apesar dessas limitações, os dados obtidos até o momento fornecem uma base sólida para o avanço das etapas subsequentes e permitem uma primeira interpretação dos fenômenos investigados.

O uso de solução salina em volume de 15  $\mu$ L demonstrou ser seguro para injeção nas larvas, não ocasionando mortalidade ou alterações comportamentais, o que permitiu a continuidade dos experimentos com as toxinas recombinantes e solução salina como controle negativo. Os indivíduos foram considerados mortos quando apresentavam rigidez corporal, ausência de resposta a estímulos e melanização extensa do tegumento (Figura 29C).



**Figura 29- Efeitos da toxina recombinante recLoxtox s1A sobre larvas de *Tenebrio molitor*.** (A) Larva saudável antes da inoculação. (B) Larva seis horas após a inoculação com recLoxtox s1A [24 ng/mL], apresentando início de melanização e redução da mobilidade. (C) Larva morta, dois dias após a aplicação, evidenciando escurecimento intenso do tegumento. A seta vermelha indica o local de aplicação.

Os resultados obtidos para os grupos contendo três larvas ( $n = 3$ ) expostas a doses progressivas de 3 ng/mL (Grupo 1), 6 ng/mL (Grupo 2), 12 ng/mL (Grupo 3) e 24 ng/mL (Grupo 4) de cada toxina, administradas em volume total de 15  $\mu$ L de solução salina, estão resumidos na Tabela 19. Entre 24 e 48 horas após a inoculação, observou-se redução da mobilidade em todos os grupos desafiados com as doses da recombinante recLoxtox s1A, exceto no Grupo 1A. As larvas do Grupo 4A apresentaram mortalidade entre o segundo e o terceiro dia pós-desafio. Nos Grupos 2A e 3A, os óbitos ocorreram entre o quarto e o sexto dias. Ao término do período de sete dias de observação, verificou-se a sobrevivência de todas as três larvas do grupo controle (inoculadas com solução salina; Grupo 5A), três larvas do Grupo 1A, duas larvas dos Grupos 2A e 3A e apenas uma larva do Grupo 4A. Com relação às larvas que receberam as doses de recLoxtox s1A, houve apenas 1 óbito entre o quinto e sexto dias no grupo 4B [24 ng/mL].

**Tabela 19 – Efeito de diferentes concentrações das toxinas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A sobre a sobrevivência e mobilidade de larvas de *Tenebrio molitor*.** As larvas foram expostas a doses de 3 ng/mL (Grupos 1A e 1B), 6 ng/mL (Grupos 2A e 2B), 12 ng/mL (Grupos 3A e 3B) e 24 ng/mL (Grupos 4A e 4B). Os Grupos 5A e 5B corresponderam aos controles negativos, inoculados com solução salina. As observações foram realizadas ao longo de sete dias, sendo cada dia indicado na coluna à esquerda.

Loxtox s1A					
	Grupo 1A 3 ng/mL	Grupo 2A 6 ng/mL	Grupo 3A 12 ng/mL	Grupo 4A 24 ng/mL	Grupo 5A Salina
Dia 1	3	3	3	3	3
Dia 2	3	3	3	2	3
Dia 3	3	3	3	1	3
Dia 4	3	3	2	1	3
Dia 5	3	2	2	1	3
Dia 6	3	2	2	1	3
Dia 7	3	2	2	1	3
Total de óbitos	0	1	1	2	0
Loxtox s11A					
	Grupo 1B 3 ng/mL	Grupo 2B 6 ng/mL	Grupo 3B 12 ng/mL	Grupo 4B 24 ng/mL	Grupo 5B Salina
Dia 1	3	3	3	3	3
Dia 2	3	3	3	3	3
Dia 3	3	3	3	3	3
Dia 4	3	3	3	3	3
Dia 5	3	3	3	3	3
Dia 6	3	3	3	2	3
Dia 7	3	3	3	2	3
Total de óbitos	0	0	0	1	0

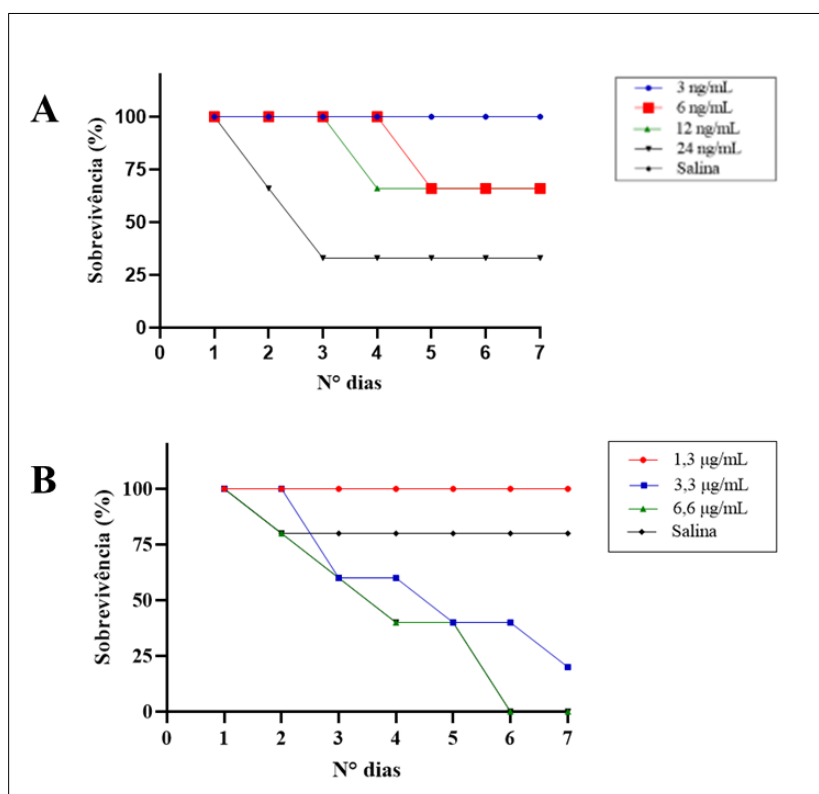
Para avaliar se concentrações mais elevadas da recLoxtox s1A seriam capazes de induzir mortalidade mais rápida em larvas de *T. molitor*, grupos compostos por cinco larvas (n=5) foram expostos a doses de 1,3 µg/mL (Grupo 3A), 3,3 µg/mL (Grupo 3B) e 6,6 µg/mL (Grupo 3C). Foram incluídos dois grupos controles: o Grupo 3D (controle negativo), inoculado com solução salina, e o Grupo 3E (controle positivo), desafiado com veneno total de *L. intermedia* na concentração de 6,6 µg/mL. A Tabela 20 apresenta o acompanhamento das larvas ao longo de sete dias.

Nenhuma larva do Grupo 3A apresentou mortalidade durante o período de observação. No Grupo 3B, apenas uma larva sobreviveu até o final do experimento, enquanto a dosagem mais alta (Grupo 3C) apresentou 100% de mortalidade. O Grupo 3E (controle positivo) não foi capaz de causar a morte de nenhuma larva, provavelmente devido à perda de atividade do veneno total e não está indicado na tabela. No Grupo 3D, observou-se o óbito de uma larva, provavelmente em decorrência de fatores mecânicos associados ao manuseio durante a aplicação. Foi observada uma redução na mobilidade das larvas aproximadamente seis horas após a inoculação das duas maiores doses de recLoxtox s11A.

**Tabela 20 – Efeito de diferentes concentrações maiores da toxina recombinante recLoxtox s1A sobre a sobrevivência e mobilidade de larvas de *Tenebrio molitor*.** As larvas foram expostas a doses de 1,3 µg/mL (Grupo 3A), 3,3 µg/mL (Grupo 3B) e 6,6 µg/mL (Grupo 3C). O controle com salina é representado pelo Grupo 3D. As observações foram realizadas ao longo de sete dias, sendo cada dia indicado na coluna à esquerda

	Loxtox s1A			
	Grupo 3A 1,3 µg/mL	Grupo 3B 3,3 µg/mL	Grupo 3C 6,6 µg/mL	Grupo 3D Salina
Dia 1	5	5	5	5
Dia 2	5	5	4	4
Dia 3	5	3	3	4
Dia 4	5	3	2	4
Dia 5	5	2	2	4
Dia 6	5	2	0	4
Dia 7	5	1	0	4
Total de óbitos	0	4	5	1

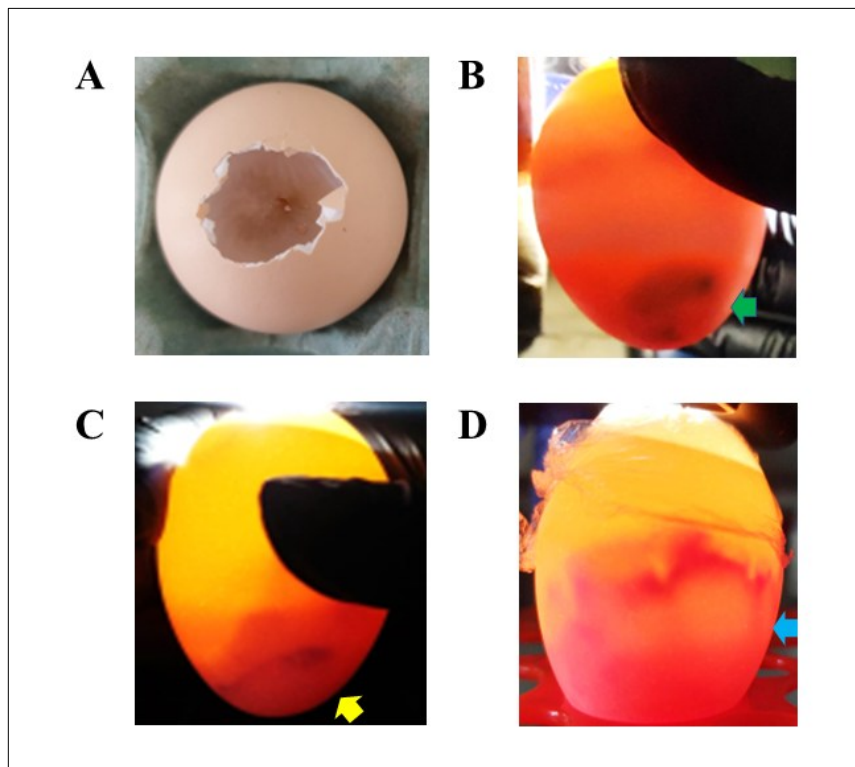
As porcentagens de sobrevivência nos grupos desafiados com as doses de recLoxtox s1A são abordadas na Figura 30.



**Figura 30 - Taxa de sobrevivência de *Tenebrio molitor* após desafio com diferentes concentrações da toxina recombinante recLoxtox s1A.** (A) Curvas de sobrevivência correspondentes às doses de 3 ng/mL (azul), 6 ng/mL (vermelha), 12 ng/mL (verde) e 24 ng/mL (preta). Observa-se que a curva do grupo controle (salina) se sobrepôs à do grupo tratado com 3 ng/mL, ambos sem registros de mortalidade. (B) Curvas de sobrevivência dos grupos expostos a 1,3 µg/mL (vermelha), 3,3 µg/mL (azul), 6,6 µg/mL (verde) e salina (preta).

5.7 *Atividade enzimática de recLoxtox s1A sobre a membrana corioalantoica (CAM) de ovos de galinha (Resultados preliminares)*

A toxina recombinante recLoxtox s1A demonstrou capacidade de atuar de forma eficaz sobre a biologia dos vasos sanguíneos da (CAM), promovendo lesão vascular. A Figura 31A mostra a janela de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> realizada no décimo dia de incubação para exposição da membrana. Na Figura 31B, observa-se o embrião em desenvolvimento. Já a Figura 31C exibe o interior do ovo sob iluminação, 6 horas após a aplicação da toxina recombinante, evidenciando o aparecimento de uma mancha avermelhada, indicativa do início do processo de ruptura vascular. Após 24 horas da injeção da recLoxtox s1A, a ação da toxina torna-se ainda mais evidente, com o aumento da área avermelhada, sinalizando uma intensa ruptura dos vasos sanguíneos da CAM.



**Figura 31** – Efeito da toxina recombinante recLoxtox s1A sobre a vascularização da CAM. (A) Janela de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> aberta no décimo dia de incubação para exposição da CAM. (B) Embrião visível (indicado pela seta verde) no interior do ovo. (C) Imagem obtida 6 horas após a aplicação da recLoxtox s1A, mostrando o início da ruptura vascular (indicado pela seta amarela). (D) Após 24 horas da aplicação, observa-se o aumento da área avermelhada (indicado pela seta azul), evidenciando uma ruptura intensa dos vasos sanguíneos da CAM.

Entre as principais vantagens da utilização da CAM como modelo experimental destacam-se a facilidade de acesso e manutenção, o rápido desenvolvimento embrionário, bem como a praticidade na manipulação e na obtenção de imagens para análise dos resultados. Além

disso, esse modelo constitui uma estratégia alternativa relevante ao uso de animais experimentais, atendendo aos princípios éticos de substituição, redução e refinamento (3Rs) na pesquisa científica (Anup *et al.*, 2024).

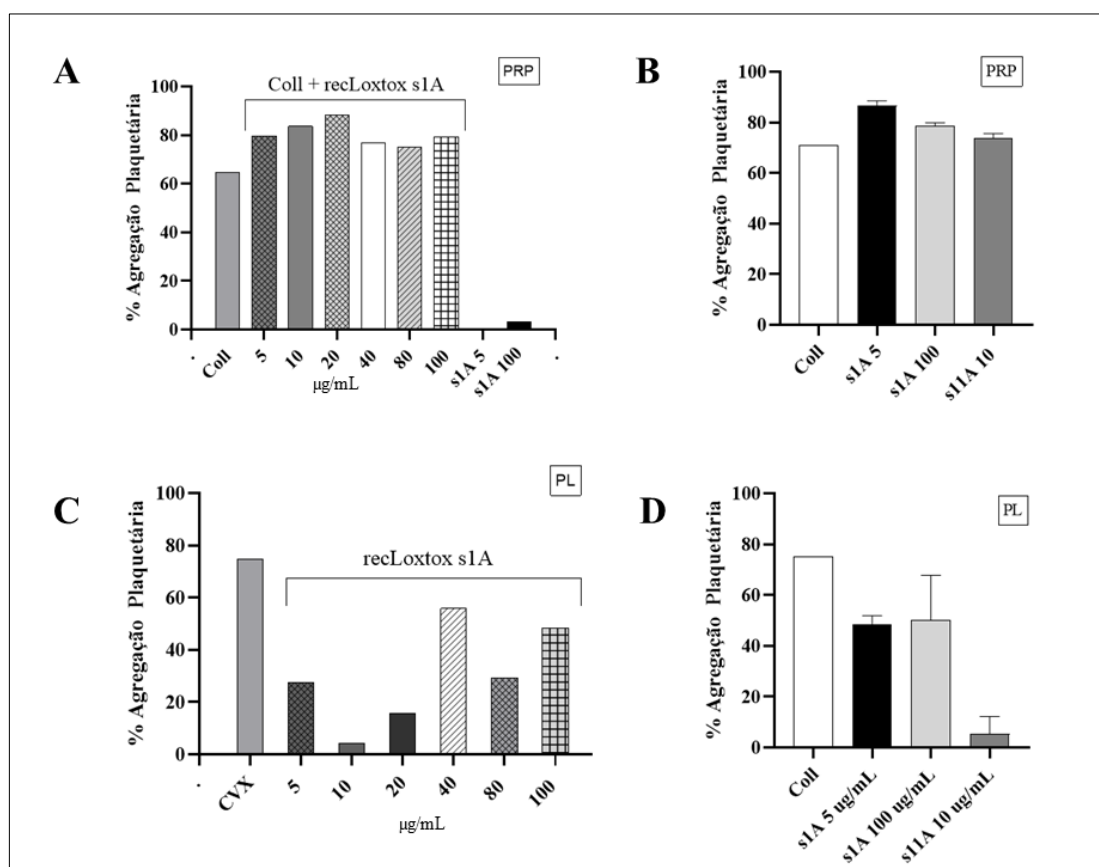
A membrana CAM tem se mostrado um bom modelo inicial para o estudo de processos de diagnóstico e terapia anti-vascular (Olive & Chin, 2006; Pegaz *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2010), pesquisas nanotoxicológicas (Buhr *et al.*, 2020), trabalhos relacionados ao crescimento tumoral e metástases (Deryugina *et al.*, 2005; Deryugina & Quigley, 2008; Cecilia Subauste *et al.*, 2009), modelo para o estudo de câncer e avaliação de drogas (Komatsu *et al.*, 2019; Y. Wang *et al.*, 2025), modelo para o estudo de alergenicidade e toxicidade (Kunzi-Rapp *et al.*, 1999; Amcoff, 2005; Slodownik *et al.*, 2009 Scheel *et al.*, 2011), entre outros. Agentes capazes de induzir a ruptura vascular também podem ser investigados por meio do modelo da CAM (Ren *et al.*, 2009; Mahal *et al.*, 2014;). Alterações na integridade dos vasos sanguíneos, incluindo hemorragias decorrentes de vazamentos ou rupturas vasculares, podem ser facilmente visualizadas nas horas subsequentes à administração desses agentes.

A integridade estrutural dos vasos sanguíneos depende, em grande parte, da organização das células endoteliais e da composição lipídica de suas membranas plasmáticas, constituídas predominantemente por fosfolipídios (Casares *et al.*, 2019). Esses componentes são essenciais para a manutenção da fluidez, permeabilidade e estabilidade da barreira endotelial. A ação da recLoxtox s1A sobre a CAM pode estar associada à ruptura dessas membranas lipídicas, resultando em aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, em danos e extravasamento de sangue observados experimentalmente. Assim, é possível sugerir que a toxina interfira nos mecanismos de integridade lipídica do endotélio, contribuindo para os efeitos hemorrágicos evidenciados nas análises morfológicas.

#### 5.8 *A atividade de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A na agregação plaquetária (Resultados preliminares)*

Como se tratava de um teste piloto, diferentes concentrações das enzimas recombinantes foram avaliadas com o objetivo de investigar possíveis efeitos em função da dose. Os resultados obtidos apresentaram diferenças marcantes entre as amostras testadas em plaquetas lavadas (PL) e plasma rico em plaquetas (PRP). Os gráficos de agregação plaquetária estão apresentados na Figura 32, sendo que A e B correspondem aos experimentos conduzidos com PRP, enquanto C e D referem-se aos ensaios realizados com plaquetas lavadas. Como agonistas foram utilizados o colágeno (Coll, 10 µg/mL) e a convulxina (CVX, 6 µg/mL).

A análise das Figuras 32A e 32B indica que não é possível atribuir às enzimas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A um efeito inibitório sobre a agregação plaquetária em PRP induzida pelo colágeno. Além disso, a aplicação das recombinantes na ausência do agonista não repercutiu em ativação das plaquetas, mostrando assim que recLoxtox s1A e recLoxtox s11A tampouco promovem a agregação de plaquetas em PRP. Por outro lado, nos ensaios conduzidos com plaquetas lavadas (Figuras 23C e 23D), observou-se que tanto a recLoxtox s1A, nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , quanto a recLoxtox s11A, na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e convulxina. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação clara de dose-dependência para esse efeito.

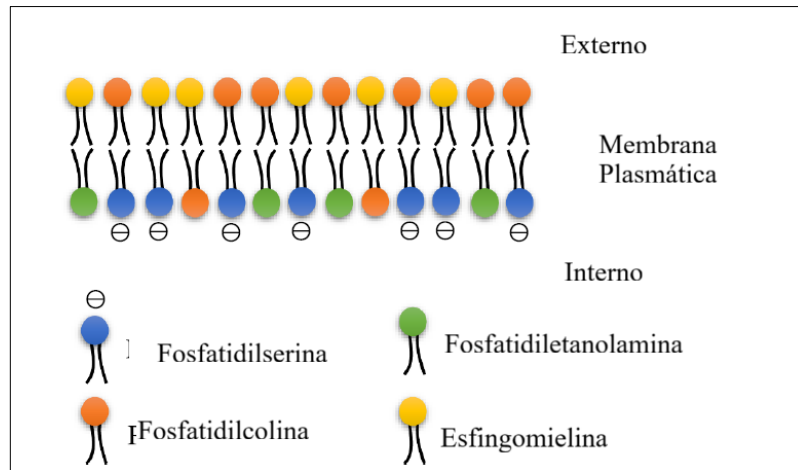


**Figura 32 – Avaliação do efeito sobre plaquetas das enzimas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A.** Gráficos representativos dos ensaios de agregação plaquetária conduzidos com plasma rico em plaquetas (PRP) e plaquetas lavadas (PL). (A–C) Ensaio realizado com PRP, avaliando o efeito das recombinantes em diferentes concentrações na presença ou ausência de colágeno (Coll, 10  $\mu\text{g/mL}$ ). (D–E) Ensaio conduzido com plaquetas lavadas. Observa-se que, no PRP, as toxinas recLoxtox s1A (5–100  $\mu\text{g/mL}$ ) e recLoxtox s11A (10  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiram a agregação plaquetária induzida pelos agonistas, enquanto em plaquetas lavadas não foi detectado efeito inibitório nem indutivo.

As Loxtox presentes nos venenos de *Loxosceles* podem ter efeitos sobre a cascata de inflamação, dermonecrose, agregação plaquetária, hemólise e nefrotoxicidade (Calabria *et al.*, 2019). De forma contraditória, estudos já demonstraram que essas enzimas podem induzir a ativação das plaquetas através da produção de ácido lisofosfatídico, que estimula receptores da membrana das plaquetas (Fukuda *et al.*, 2017).

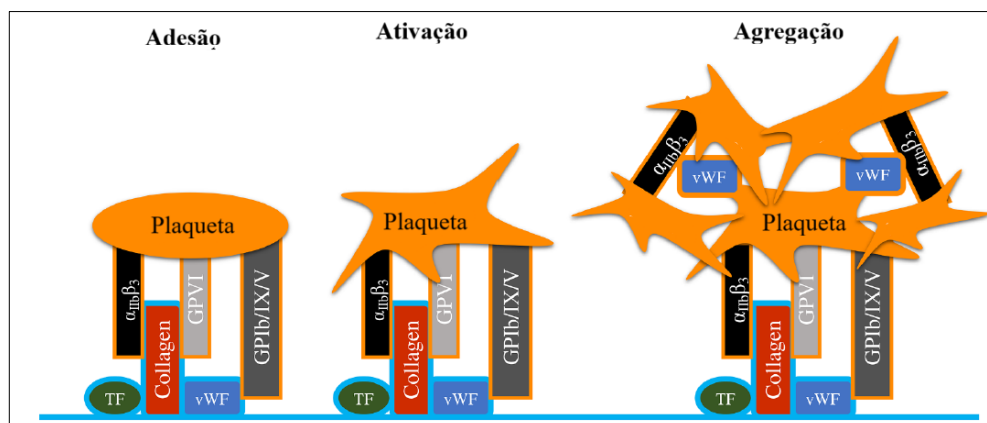
Ensaio de agregação plaquetária no trabalho publicado por Rafaela Silva Magalhães *et al.* demonstraram comportamentos distintos entre os venenos de diferentes espécies de *Loxosceles*. O veneno total de *L. amazonica* e *L. similis* induziu agregação espontânea de plaquetas lavadas nas concentrações de 100 e 200 µg/mL. Em contraste, o veneno de *L. aff. variegata* não promoveu agregação, mas apresentou capacidade inibitória significativa sobre a agregação plaquetária previamente induzida por agonistas como colágeno e convulxina. Esses resultados indicam que os venenos totais de *L. amazonica* e *L. similis* possuem atividade pró-trombótica, enquanto o de *L. aff. variegata* exerce efeito antagônico, contribuindo para a compreensão das variações nos efeitos hematotóxicos entre as diferentes espécies de *Loxosceles* (Rafaela Silva-Magalhães *et al.*, 2024).

As plaquetas são células anucleadas derivadas de megacariócitos da medula óssea que circulam normalmente na corrente sanguínea em seu estado inativo. A membrana plasmática das plaquetas é composta de lipídios estruturais incluindo fosfatidilcolina (FC), fosfatidilserina (FS), fosfatidiletanolamino (FE), além de esfingolipídeos como esfingomielina (SM) e colesterol (O'Donnell *et al.*, 2014). Esses fosfolipídeos apresentam uma distribuição assimétrica e, devido à mudança conformacional resultante da ativação das plaquetas, uma carga negativa é atribuída à membrana plasmática, o que possibilita a sua adesão ao endotélio e a geração de trombina através da cascata de coagulação (Figura 33).



**Figura 33 – Distribuição assimétrica dos fosfolípidios na membrana plasmática das plaquetas.** Em uma fase normal de repouso, conforme ilustrado nesta figura, a fosfatidilserina — um fosfolípido com carga negativa — localiza-se predominantemente na face interna da membrana plasmática plaquetária, mantendo a face externa eletricamente neutra. Adaptado de (Haginoya *et al.*, 2023).

Quando um dano vascular ocorre, as plaquetas respondem rapidamente através da sua adesão ao local, que promove sua ativação e mudança conformacional, o que favorece o recrutamento de mais plaquetas (agregação) para que seja formado um coágulo maior de forma a impedir sangramentos mais severos (Thomas, 2019). Esses três processos (adesão, ativação e agregação) são os principais estágios da hemostase primária (Figura 34). As alterações estruturais também corroboram para a ativação da maior parte das glicoproteínas presentes nas membranas das plaquetas (GPVI, GPIb./IX/V e integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) (Jackson, 2007). Em síntese, a adesão ocorre quando o dano endotelial expõe o colágeno subendotelial. Esse colágeno pode se ligar aos receptores plaquetários de fibrinogênio (integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3), ao receptor glicoproteico GPVI ou ao fator de von Willebrand (vWF). O vWF é liberado inicialmente pelo endotélio, e tanto o colágeno quanto o vWF interagem com o complexo glicoproteico plaquetário GPIb/IX/V. As interações entre as plaquetas e os complexos  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, GPVI e colágeno-vWF-GPIb/IX/V promovem a ativação plaquetária, incluindo a liberação dos grânulos, e induzem uma mudança na forma das plaquetas, de discoide para arredondada, com formação de pseudópodes. Por fim, a integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, em cooperação com o vWF liberado principalmente pelos grânulos alfa das plaquetas, promove a agregação por meio da ligação cruzada entre múltiplas plaquetas ativadas, formando o tampão plaquetário. Esse tampão é suficiente para conter o sangramento em vasos de pequeno calibre, mas não em vasos maiores, que requerem a deposição adicional de fibrina entrecruzada (gerada pela hemostasia secundária) sobre o tampão plaquetário para interromper o sangramento.



**Figura 34** – As três etapas da atividade plaquetária durante a hemostasia primária. Adaptada de: (Haginoya *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos para as enzimas recombinantes recLoxtox s1A e recLoxtox s11A, quando comparados aos achados dos ensaios realizados com o veneno bruto de *L. similis*, indicam que a atividade pró-trombótica observada no veneno total provavelmente depende da ação sinérgica de múltiplos componentes, não sendo reproduzida isoladamente pelas toxinas Loxtox s1A e s11A. Por outro lado, o efeito inibitório da agregação plaquetária observado nas plaquetas lavadas tratadas com as recombinantes (Figuras 32C e 32D) apresenta semelhança com o perfil do veneno de *L. aff. variegata*, o qual demonstrou capacidade de bloquear a agregação induzida por agonistas. Essa correspondência sugere que as Loxtox isoladas possam estar envolvidas em mecanismos antagônicos à ativação plaquetária. Além disso, a recLoxtox s1A exibiu um maior potencial inibitório sobre a agregação induzida por convulxina em comparação à induzida por colágeno, indicando que sua ação pode estar relacionada a vias dependentes de integrinas (como  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) ou de glicoproteínas de membrana plaquetária, como o receptor GPVI, ou ainda simplesmente pela sua atividade na degradação direta na membrana das plaquetas.

A inibição da agregação plaquetária em plaquetas lavadas pode também estar relacionada à ação das proteínas recombinantes sobre os fosfolipídios da membrana plaquetária, uma vez que, nesse contexto, há uma maior exposição desses componentes em função da maior densidade de plaquetas. Dessa forma, os dados obtidos com as proteínas recombinantes contribuem para elucidar como diferentes isoformas de toxinas de *Loxosceles* podem modular de maneiras distintas as respostas hemostáticas, refletindo a variabilidade funcional observada entre as espécies do gênero.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a análise transcriptômica da glândula de veneno de *L. similis*, realizada por meio de tecnologias de NGS, permitiu uma caracterização abrangente dos principais conjuntos de genes expressos e a identificação de moléculas potencialmente envolvidas na toxicidade do veneno. Foram identificadas novas sequências de Loxtox pertencentes às subfamílias s1A e s11A, além de metaloproteases, hialuronidase, toxinas inseticidas e fosfolipase A<sub>2</sub>. As isoformas recombinantes recLoxtox s1A (~34,2 kDa) e recLoxtox s11A (~34,9 kDa) foram expressas e purificadas, possibilitando a caracterização funcional de suas atividades biológicas.

Além de sua conhecida ação dermonecrótica, a recLoxtox s1A demonstrou toxicidade em larvas de *T. molitor* e em vasos sanguíneos da CAM. As toxinas recombinantes também apresentaram efeitos sobre a atividade de plaquetas lavadas, sugerindo que sua ação pode envolver vias dependentes de integrinas ou glicoproteínas de membrana, como o receptor GPVI.

A abordagem empregada neste trabalho amplia o entendimento sobre a diversidade de toxinas produzidas por aranhas do gênero *Loxosceles* e oferece subsídios valiosos para pesquisas nas áreas evolutiva, biotecnológica e de saúde pública. Os resultados obtidos revelam uma complexa rede de moléculas expressas na glândula de veneno de *L. similis*, responsáveis por seus efeitos locais e sistêmicos.

Por fim, este estudo reforça a relevância de *L. similis* como espécie sinantrópica de importância médica, uma vez que pode ser encontrada em áreas turísticas, ambientes urbanos e no interior de residências. As informações aqui apresentadas contribuem não apenas para o avanço do conhecimento sobre a biologia e o veneno dessa espécie, mas também para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento do loxoscelismo. Ademais, os achados abrem novas perspectivas para a descoberta de inibidores específicos dos principais componentes tóxicos e para a prospecção biotecnológica de moléculas de interesse médico e agrícola, além de fomentarem o desenvolvimento de alternativas experimentais que reduzam o uso de vertebrados em pesquisa científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulkader, R. C. R. M., Barbaro, K. C., Barros, E. J. G., & Burdmann, E. A. (2008). Nephrotoxicity of Insect and Spider Venoms in Latin America. *Seminars in Nephrology*, 28(4). <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2008.04.006>
- Amcoff, P. (2005). Appendix 5: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. ATLA Alternatives to Laboratory Animals, 33(1\_suppl). <https://doi.org/10.1177/026119290503301s04>
- Amorim, M. L. P., Simão, D. G. de O., de Albuquerque, J. P. V. E. S., Ramos, B. M. T., Do Nascimento, G. J. L., & de Mello, M. J. G. (2024). Brown spiders (*Loxosceles*) are taking hold in Pernambuco, Brazil: a case series, 2018-2022. *Epidemiologia e Serviços de Saude*, 33. <https://doi.org/10.1590/S2237-96222024v33e2023568.en>
- Andersen, R. J., Campoli, J., Johar, S. K., Schumacher, K. A., & Allison, E. J. (2011). Suspected brown recluse envenomation: A case report and review of different treatment modalities. *Journal of Emergency Medicine*, 41(2). <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2009.08.055>
- Andrade R. M. G., Galati E. A. B., & Tambourgi D. V. (2001). Presença de *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1998 (Araneae: Sicariidae) na Serra da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(3), 275–277. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000300008>
- Anup, A., Dieterich, S., Oreffo, R. O. C., Dailey, H. L., Lang, A., Haffner-Luntzer, M., & Hixon, K. R. (2024). Embracing ethical research: Implementing the 3R principles into fracture healing research for sustainable scientific progress. *Journal of Orthopaedic Research*, 42(3). <https://doi.org/10.1002/jor.25741>
- Appel, M. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Paludo, K. S., Silva, D. T., Chaves, D. M., da Silva, P. H., Mangili, O. C., Senff-Ribeiro, A., Gremski, W., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2008). Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.007>
- Araujo, S. C., Castanheira, P., Alvarenga, L. M., Mangili, O. C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2003). Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. *Toxicon*, 41(3). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00282-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00282-9)
- Barbaro, K. C., Ferreira, M. L., Cardoso, D. F., Eickstedt, V. R. D., & Mota, I. (1996). Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(11):1491-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9196551/>
- Bertani, R., Bichuette, M. E., Cordeiro, L. M., & Gallão, J. E. (2024). Three new species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Araneae, Sicariidae) from Brazilian caves. *European Journal of Taxonomy*, 921. <https://doi.org/10.5852/ejt.2024.921.2419>

- Bertani, R., Fukushima, C. S., & Nagahama, R. H. (2010). *Loxosceles chapadensis* (Araneae: Sicariidae): a new recluse spider species of the gaucho group from Brazil. *Journal of Arachnology*, 38(2), 364–367. <https://doi.org/10.1636/A09-92.1>
- Bertani, R., von Schimonsky, D. M., Gallão, J. E., & Bichuette, M. E. (2018a). Four new troglophilic species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832: contributions to the knowledge of recluse spiders from Brazilian caves (Araneae, Sicariidae). *ZooKeys*, 806, 47–72. <https://doi.org/10.3897/zookeys.806.27404>
- Bertoni da Silveira, R., Pigozzo, R. B., Chaim, O. M., Appel, M. H., Dreyfuss, J. L., Toma, L., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2006). Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie*, 88(9). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.008>
- Binford, G. J., & Wells, M. A. (2003). The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 135(1). [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00045-9)
- Boia-Ferreira, M., Moreno, K. G., Basílio, A. B. C., da Silva, L. P., Vuitika, L., Soley, B., Wille, A. C. M., Donatti, L., Barbaro, K. C., Chaim, O. M., Gremski, L. H., Veiga, S. S., & Senff-Ribeiro, A. (2019). TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. *Cells*, 8(12), 1489. <https://doi.org/10.3390/cells8121489>
- Botzki, A., Rigden, D. J., Braun, S., Nukui, M., Salmen, S., Hoehstetter, J., Bernhardt, G., Dove, S., Jedrzejewski, M. J., & Buschauer, A. (2004). L-ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44). <https://doi.org/10.1074/jbc.M406146200>
- Buhr, C. R., Wiesmann, N., Tanner, R. C., Brieger, J., & Eckrich, J. (2020). The chorioallantoic Membrane Assay in Nanotoxicological Research - An alternative for *in vivo* Experimentation. *Nanomaterials (Basel)* 10(12):2328. <https://doi.org/10.3390/nano10122328>
- Burke, J. E., & Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 23(1)49-59. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>
- Calabria, P. A. L., Shimokava-Falcao, L. H. A. L., Colombini, M., Moura-da-Silva, A. M., Barbaro, K. C., Faquim-Mauro, E. L., & Magalhaes, G. S. (2019). Design and production of a recombinant hybrid toxin to raise protective antibodies against *Loxosceles* spider venom. *Toxins*, 11(2) 108. <https://doi.org/10.3390/toxins11020108>
- Cárdenas, M., Pascual, F., Campos, M., & PLATNICK, N. I. (2017). World Spider Catalog (2025). World Spider Catalog. Version 26. Natural History Museum Bern, disponível em <http://wsc.nmbe.ch>, acessado em {10/10/2025}. doi: 10.24436/2.
- Cardoso, F. C., Dekan, Z., Rosengren, K. J., Erickson, A., Vetter, I., Deuis, J. R., Herzig, V., Alewood, P. F., King, G. F., & Lewis, R. J. (2015). Identification and characterization of ProTx-III [ $\mu$ -TRTX-Tp1a], a new voltage-gated sodium channel inhibitor from venom of the tarantula *Thrixopelma pruriens*. *Molecular Pharmacology*, 88(2). <https://doi.org/10.1124/mol.115.098178>

- Cardoso, F. C., & Lewis, R. J. (2019). Structure–Function and Therapeutic Potential of Spider Venom-Derived Cysteine Knot Peptides Targeting Sodium Channels. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00366>
- Cardoso, P., Pekár, S., Jocqué, R., & Coddington, J. A. (2011). Global patterns of guild composition and functional diversity of spiders. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021710>
- Carmo, A. O., Oliveira-Mendes, B. B. R., Horta, C. C. R., Magalhães, B. F., Dantas, A. E., Chaves, L. M., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2014). Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. *Toxicon*, 90, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.07.014>
- Casares, D., Escribá, P. V., & Rosselló, C. A. (2019). Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>
- Catalán, A., Cortés, W., Muñoz, C., & Araya, J. E. (2014). Tryptophan and aspartic acid residues present in the glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (GDPD) domain of the *Loxosceles laeta* phospholipase D are essential for substrate recognition. *Toxicon*, 81, 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.01.011>
- Catalán, A., Cortes, W., Sagua, H., González, J., & Araya, J. E. (2011). Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: Cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(6), 393-403. <https://doi.org/10.1002/jbt.20399>
- Cecilia Subauste, M., Kupriyanova, T. A., Conn, E. M., Ardi, V. C., Quigley, J. P., & Deryugina, E. I. (2009). Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. *Clinical and Experimental Metastasis*, 26(8), 1033-1047. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9293-4>
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., & Frasconi, P. (2006). Disulfind: A disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Research*, 34(Issue\_suppl\_2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl266>
- Chaim, O. M., Da Silveira, R. B., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V. P., Sade, Y. B., Bóia-Ferreira, M., Gremski, L. H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Takahashi, H. K., Toledo, M. S., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2011). Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.11.005>
- Chaim, O. M., Sade, Y. B., Da Silveira, R. B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., Mangili, O. C., Gremski, W., Von Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Sanches Veiga, S. (2006). Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 211(1). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.015>
- Chaim, O. M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A. C. M., Ferrer, V. P., Matsubara, F. H., Mangili, O. C., Silveira, R. B. da, Gremski, L. H., Gremski, W., Senff-

- Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2011). Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. *Toxins*, 3(3), 309–344. <https://doi.org/10.3390/toxins3030309>
- Chao, K. L., Muthukumar, L., & Herzberg, O. (2007). Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry*, 46(23). <https://doi.org/10.1021/bi700382g>
- Chatzaki, M., Horta, C. C., Almeida, M. O., Pereira, N. B., Mendes, T. M., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Moro, L., Chávez-Olórtegui, C., Horta, M. C. R., & Kalapothakis, E. (2012). Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. *Toxicon*, 60(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.007>
- Chaves-Moreira, D., Chaim, O. M., Sade, Y. B., Paludo, K. S., Gremski, L. H., Donatti, L., De Moura, J., Mangili, O. C., Gremski, W., Da Silveira, R. B., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2009). Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4), 655–666. <https://doi.org/10.1002/jcb.22148>
- Chaves-Moreira, D., Senff-Ribeiro, A., Wille, A. C. M., Gremski, L. H., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2017). Highlights in the knowledge of brown spider toxins. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 23(1). <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0097-8>
- Chaves-Moreira, D., Souza, F. N., Fogaça, R. T. H., Mangili, O. C., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2011). The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(9), 2529–2540. <https://doi.org/10.1002/jcb.23177>
- Clement, H., Olvera, A., Rodríguez, M., Zamudio, F., Palomares, L. A., Possani, L. D., Odell, G. V., Alagón, A., & Sánchez-López, R. (2012). Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon*, 60(7). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.018>
- Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C. P., & Nakajima, T. (2000). Isolation, synthesis and pharmacological characterization of  $\delta$ -palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *European Journal of Biochemistry*, 267(18). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01653.x>
- da Silva, P. H., da Silveira, R. B., Helena Appel, M., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2004). Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, 44(7), 693–709. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>
- da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2007). Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- $\beta$ -N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, 49(6), 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.024>
- Da Silveira, R. B., Dos Santos Filho, J. F., Mangili, O. C., Veiga, S. S., Gremski, W., Nader, H. B., & Von Dietrich, C. P. (2002). Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon*, 40(6). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00078-8)

- Da Silveira, R. B., Wille, A. C. M., Chaim, O. M., Appel, M. H., Silva, D. T., Franco, C. R. C., Toma, L., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2007). Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochemical Journal*, 406(2), 355-363. <https://doi.org/10.1042/BJ20070363>
- Dantas, A. E., Carmo, A. O., Horta, C. C. R., Leal, H. G., Oliveira-Mendes, B. B. R., Martins, A. P. V., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2016). Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland. *Toxicon*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.002>
- Dantas, A. E., Horta, C. C. R., Martins, T. M. M., do Carmo, A. O., Mendes, B. B. R. de O., Goes, A. M., Kalapothakis, E., & Gomes, D. A. (2014). Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts. *Toxicon*, 84, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.002>
- de Andrade, R. M. G., De Oliveira, K. C., Giusti, A. L., Da Silva, W. D., & Tambourgi, D. V. (1999). Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, 37(4). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00200-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00200-1)
- de Andrade, S. A., Fernandes Pedrosa, M. F., Gonçalves De Andrade, R. M., Vilela Oliva, M. L., Van Den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2005). Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(1), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.146>
- de Castro, C. S., Silvestre, F. G., Araújo, S. C., Yazbeck, G. de M., Mangili, O. C., Cruz, I., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2004). Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon*, 44(3), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.028>
- de Oliveira Christoff, A., de Oliveira, A., Chaim, O. M., Lugarini, D., Bastos Pereira, A. L., Paludo, K. S., Queiroz Telles, J. E., Bracht, A., Veiga, S. S., & Acco, A. (2008). Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. *Toxicon*, 52(6), 695-704. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.08.001>
- de Oliveira-Mendes, B. B. R., Miranda, S. E. M., Sales-Medina, D. F., de Freitas Magalhães, B., Kalapothakis, Y., de Souza, R. P., Cardoso, V. N., Barros, A. L. B., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E., & Horta, C. C. R. (2019). Inhibition of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase affects venom biodistribution. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007048>
- de Santi Ferrara, G. I., Fernandes-Pedrosa, M. de F., Junqueira-de-Azevedo, I. de L. M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Portaro, F. C. V., Manzoni-de-Almeida, D., Murakami, M. T., Arni, R. K., van den Berg, C. W., Ho, P. L., & Tambourgi, D. V. (2009). SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon*, 53(7–8), 743-753. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.013>
- de Souza, P. C., Morey, A. T., Castanheira, G. M., Bocate, K. P., Panagio, L. A., Ito, F. A., Furlaneto, M. C., Yamada-Ogatta, S. F., Costa, I. N., Mora-Montes, H. M., & Almeida, R. S. (2015). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal

infections. *Journal of Microbiological Methods*, 118, 182-186. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.004>

De-Bona, E., Chaves-Moreira, D., Batista, T. B. D., Justa, H. C. da, Rossi, G. R., Antunes, B. C., Matsubara, F. H., Minozzo, J. C., Wille, A. C. M., Veiga, S. S., Senff-Ribeiro, A., & Gremski, L. H. (2021). Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109759>

Del Brutto, O. H. (2013). Neurological effects of venomous bites and stings. Snakes, spiders, and scorpions. *Handbook of Clinical Neurology* 114, 349-368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00028-5>

Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology* 130, 1119-1130. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0536-2>

Deryugina, E. I., Zijlstra, A., Partridge, J. J., Kupriyanova, T. A., Madsen, M. A., Papagiannakopoulos, T., & Quigley, J. P. (2005). Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination. *Cancer Research*, 65(23), 10959-10969. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2228>

Dias-Lopes, C., Felicori, L., Guimarães, G., Gomes, E. R. M., Roman-Campos, D., Duarte, H., Damasceno, D., Martins, M., Kalapothakis, E., Almeida, A. P., Granier, C., Cruz, J. S., Guatimosim, S., & Chávez-Olórtegui, C. (2010). Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. *Toxicon*, 56(8), 1426–1435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.008>

Dragulev, B., Bao, Y., Ramos-Cerrillo, B., Vazquez, H., Olvera, A., Stock, R., Alagon, A., & Fox, J. W. (2007). Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: Insights into spider venom dermonecrosis. *Journal of Investigative Dermatology* 127(5), 1264-1266. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700644>

Estrada-Gomez, S., Muñoz, L. J. V., Lancho, P., & Latorre, C. S. (2015). Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* (Araneae:Ctenidae). *Toxins*, 7(8), 2872-2887. <https://doi.org/10.3390/toxins7082872>

Estrada-Gómez, S., Vargas-Muñoz, L. J., Latorre, C. S., Saldarriaga-Cordoba, M. M., & Arenas-Gómez, C. M. (2021). Analysis of high molecular mass compounds from the spider *Pamphobeteus verdolaga* venom gland. A transcriptomic and ms id approach. *Toxins*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/toxins13070453>

Estrada-Gómez, S., Vargas-Muñoz, L. J., Segura Latorre, C., Saldarriaga-Cordoba, M. M., & Arenas-Gómez, C. M. (2021). Analysis of High Molecular Mass Compounds from the Spider *Pamphobeteus verdolaga* Venom Gland. A Transcriptomic and MS ID Approach. *Toxins*, 13(7), 453. <https://doi.org/10.3390/toxins13070453>

Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S. S., Elias, M. C. Q. B., Graner, E., Mangili, O. C., & Brentani, R. R. (1998). Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic,

fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*, 36(7), 1039-1051. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00083-4)

Felicori, L., Araujo, S. C., Machado de Ávila, R. A., Sanchez, E. F., Granier, C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2006). Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon*, 48(5), 509-519. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.019>

Felicori, L., Fernandes, P. B., Giusta, M. S., Duarte, C. G., Kalapothakis, E., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2009). An *in vivo* protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine*, 27(31), 4201-4208. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.038>

Felsensteins J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>

Fernandes Pedrosa, M. D. F., Junqueira de Azevedo, I. D. L. M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Van Den Berg, C. W., Ramos, C. R. R., Lee Ho, P., & Tambourgi, D. V. (2002). Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), 638-645. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02521-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02521-4)

Fernandes-Pedrosa, M. de F., Junqueira-de-Azevedo, I. de L. M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Kobashi, L. S., Almeida, D. D., Ho, P. L., & Tambourgi, D. V. (2008). Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>

Ferreira, R. L., Martins, R. P., & Yanega, D. (2000). Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. *Ecotropica* 6(2). <https://bdc.icmbio.gov.br/handle/cecav/740>

Ferrer, V. P., de Mari, T. L., Gremski, L. H., Trevisan Silva, D., da Silveira, R. B., Gremski, W., Chaim, O. M., Senff-Ribeiro, A., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2013). A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002206>

Figueiredo, S. G., Garcia, M. E. L. P., Valentim, A. D. C., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R., & Richardson, M. (1995). Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin T×4(6-1) from the venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer* (keys). *Toxicon*, 33(1), 83-93. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00130-Z](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00130-Z)

Fingermann, M., de Roodt, A. R., Cascone, O., & Miranda, M. V. (2020). Biotechnological potential of Phospholipase D for *Loxosceles* antivenom development. *Toxicon: X*, 6, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100036>

Foradori, M. J., Keil, L. M., Wells, R. E., Diem, M., & Tillinghast, E. K. (2001). An examination of the potential role of spider digestive proteases as a causative factor in spider bite necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(2), 209–218. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00239-3)

- Fox, J. W., & Bjarnason, J. B. (1995). Atrollysins: Metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)48024-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)48024-2)
- Fukuda, D. A., Caporrino, M. C., Barbaro, K. C., Della-Casa, M. S., Faquim-Mauro, E. L., & Magalhaes, G. S. (2017). Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* binds to platelets and promotes phosphatidylserine exposure. *Toxins*, 9(6), 191. <https://doi.org/10.3390/toxins9060191>
- Fukushima, C. S., de Andrade, R. M. G., & Bertani, R. (2017). Two new Brazilian species of *Loxosceles* Heineken & Lowe; Lowe, 1832 with remarks on amazonica and rufescens groups (Araneae, Sicariidae). *ZooKeys*, 667, 67–94. <https://doi.org/10.3897/zookeys.667.11369>
- Gertsch. (1967). The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 136(3), 119–173. <http://hdl.handle.net/2246/1989>
- Giorgio, C. M., Licata, G., Tancredi, V., Franzese, P., Giorgio, N. M., Argenziano, G., & Di Brizzi, E. V. (2025). Novel therapeutic approach for loxoscelism: efficacy of cefixime and netilmicin sulfate combination therapy. *Dermatology Reports* 17(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40019441/>
- Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences* 80(21). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.037>
- Gomes, M. T. R., Guimarães, G., Frézard, F., Kalapothakis, E., Minozzo, J. C., Chaim, O. M., Veiga, S. S., Oliveira, S. C., & Chávez-Olórtegui, C. (2011). Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. *Toxicon*, 57(4), 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.001>
- Gomez, M. V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., & Prado, M. A. M. (2002). Phoneutria nigriventer venom: A cocktail of toxins that affect ion channels. *Em Cellular and Molecular Neurobiology* 22, 579-588. <https://doi.org/10.1023/A:1021836403433>
- Gomis-Rüth, F. X., Trillo-Muyo, S., & Stöcker, W. (2012). Functional and structural insights into astacin metalloproteinases. *Em Biological Chemistry* 393(10). <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0149>
- Gonçalves-de-Andrade, R., Bertani, R., Hiroaki Nagahama, R., & Ribeiro Barbosa, M. F. (2012). *Loxosceles niedeguidonae* (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region. *ZooKeys*, 175, 27–36. <https://doi.org/10.3897/zookeys.175.2259>
- Gremski, L. H., da Justa, H. C., Polli, N. L. C., Schluga, P. H. de C., Theodoro, J. L., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2023). Systemic Loxoscelism, Less Frequent but More Deadly: The Involvement of Phospholipases D in the Pathophysiology of Envenomation. *Toxins* 15(1), 17. <https://doi.org/10.3390/toxins15010017>
- Gremski, L. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Probst, C. M., Ferrer, V. P., Nowatzki, J., Weinschutz, H. C., Madeira, H. M., Gremski, W., Nader, H. B., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2010). A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Molecular BioSystems*, 6(12), 2403. <https://doi.org/10.1039/c004118a>

Gremski, L. H., Matsubara, F. H., da Justa, H. C., Schemczssen-Graeff, Z., Baldissera, A. B., de Caires Schluga, P. H., de Oliveira Leite, I., Boia-Ferreira, M., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2021). Brown spider venom toxins: What are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins? *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 27. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0188>

Gremski, L. H., Matsubara, F. H., Polli, N. L. C., Antunes, B. C., Schluga, P. H. de C., Justa, H. C. da, Minozzo, J. C., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2021). Prospective Use of Brown Spider Venom Toxins as Therapeutic and Biotechnological Inputs. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.706704>

Gremski, L. H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V. P., Matsubara, F. H., Meissner, G. O., Wille, A. C. M., Vuitika, L., Dias-Lopes, C., Ullah, A., de Moraes, F. R., Chávez-Olórtegui, C., Barbaro, K. C., Murakami, M. T., Arni, R. K., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2014). Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*, 83, 91–120. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>

Guerra-Duarte, C., Rebello Horta, C. C., Ribeiro Oliveira-Mendes, B. B., de Freitas Magalhães, B., Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Fonseca de Freitas, C., Campolina, D., Pereira de Oliveira Pardal, P., Lira-da-Silva, R., Machado de Ávila, R. A., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2019). Determination of hyaluronidase activity in *Tityus* spp. Scorpion venoms and its inhibition by Brazilian antivenoms. *Toxicon*, 167, 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.019>

Haas, J., Bêe, E. S., Haida, K. S., & Gluzezak, R. M. (2013). Acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* spp. em Laranjeiras do Sul – Portal Regional da BVS - Informação e Conhecimento para a Saúde. *BVS*, 34(1), 15-22. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-724400>

Haginoya, S., Thomovsky, E. J., Johnson, P. A., & Brooks, A. C. (2023). Clinical Assessment of Primary Hemostasis: A Review. *Topics in Companion Animal Medicine* (Vols. 56–57). <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2023.100818>

Harui, A., & Roth, M. D. (2022). Hyaluronidase Enhances Targeting of Hydrogel-Encapsulated Anti-CTLA-4 to Tumor Draining Lymph Nodes and Improves Anti-Tumor Efficacy. *Gels*, 8(5), 294. <https://doi.org/10.3390/gels8050284>

Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3(1), 66–98. <https://doi.org/10.1128/cmr.3.1.66>

Hauke, T. J., & Herzig, V. (2017). Dangerous arachnids - Fake news or reality? *Toxicon* 138, 173-183. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.024>

Herzig, V., & King, G. (2015). The Cystine Knot Is Responsible for the Exceptional Stability of the Insecticidal Spider Toxin  $\omega$ -Hexatoxin-Hv1a. *Toxins*, 7(10), 4366–4380. <https://doi.org/10.3390/toxins7104366>

Hogan, C. J., Barbaro, K. C., & Winkel, K. (2004). Loxoscelism: Old obstacles, new directions. *Em Annals of Emergency Medicine* 44(6), 608-624. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2004.08.028>

- Holt, R. A., & Jones, S. J. M. (2008). The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Research*, 18(6). <https://doi.org/10.1101/gr.073262.107>
- Horta, C. C. R., Oliveira-Mendes, B. B. R., Do Carmo, A. O., Siqueira, F. F., Barroca, T. M., Dos Santos Nassif Lacerda, S. M., De Almeida Campos, P. H., De França, L. R., Ferreira, R. L., & Kalapothakis, E. (2013). Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with *Loxosceles* spider venom. *Journal of Investigative Dermatology* 133(6), 1682-1685. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.40>
- Hubbard, J. J., & James, L. P. (2011). Complications and outcomes of brown recluse spider bites in children. *Clinical Pediatrics*, 50(3). <https://doi.org/10.1177/0009922810388510>
- Isbister, G. K., Graudins, A., White, J., & Warrell, D. (2003). Antivenom treatment in arachnidism. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* 41(3). <https://doi.org/10.1081/CLT-120021114>
- Ivanušec, A., Šribar, J., & Križaj, I. (2022). Secreted Phospholipases A2 – not just Enzymes: Revisited. *International Journal of Biological Sciences* 18(2), 873-888. <https://doi.org/10.7150/ijbs.68093>
- Jackson, S. P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 109(12), 5087-5095. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-027698>
- Jones D.T., Taylor W.R., & Thornton J.M. (1992). The rapid Generation of mutation data matrices from proteins sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8, 275-282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Kalapothakis, E., Araujo, S. C., De Castro, C. S., Mendes, T. M., Gomez, M. V., Mangili, O. C., Gubert, I. C., & Chávez-Olórtegui, C. (2002). Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, 40(12), 1691-1699. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00201-5)
- Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., de Castro, C. S., Silvestre, F. G., Laborne, F. V., de Moura, J. F., Veiga, S. S., Chávez-Olórtegui, C., Granier, C., & Barbaro, K. C. (2007). The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon*, 50(7), 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.001>
- Kalapothakis, Y., Miranda, K., Aragão, M., Larangote, D., Braga-Pereira, G., Noetzold, M., Molina, D., Langer, R., Conceição, I. M., Guerra-Duarte, C., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., & Borges, A. (2024). Divergence in toxin antigenicity and venom enzymes in *Tityus melici*, a medically important scorpion, despite transcriptomic and phylogenetic affinities with problematic Brazilian species. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130311>
- Kalapothakis, Y., Miranda, K., Pereira, A. H., Witt, A. S. A., Marani, C., Martins, A. P., Leal, H. G., Campos-Júnior, E., Pimenta, A. M. C., Borges, A., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2021). Novel components of *Tityus serrulatus* venom: A transcriptomic approach. *Toxicon*, 189, 91-104. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.11.001>
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: Structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 3, 422-433. <https://doi.org/10.1038/nrc1094>

- Kim, S. H., Turnbull, J., & Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology* 209(2), 139-151. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>
- Koch, C. M., Chiu, S. F., Akbarpour, M., Bharat, A., Ridge, K. M., Bartom, E. T., & Winter, D. R. (2018). A beginner's guide to analysis of RNA sequencing data. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 59(2). <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0430TR>
- Komatsu, A., Higashi, Y., & Matsumoto, K. (2019). Various CAM tumor models 46, 37–57. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2019.10.001>
- Krayem, N., & Gargouri, Y. (2020). Scorpion venom phospholipases A2: A minireview. *Toxicon* 184, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.020>
- Kreil, G. (1995). Hyaluronidases — a group of neglected enzymes. *Protein Science* 4(9), 1666-1669. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040902>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054>
- Kunzi-Rapp, K., Rück, A., & Kaufmann, R. (1999). Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. *Archives of Dermatological Research*, 291, 290-295. <https://doi.org/10.1007/s004030050410>
- Kurpiewski, G., Forrester, L. J., Barrett, J. T., & Campbell, B. J. (1981). Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *BBA - General Subjects*, 678(3), 467-476. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90128-8)
- Kusma, J., Chaim, O. M., Wille, A. C. M., Ferrer, V. P., Sade, Y. B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O. C., & Veiga, S. S. (2008). Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie*, 90(11–12), 1722-1736. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.011>
- L., I., H.D., S., & H.J., (Eds). (1991). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology 33(6). <https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000600015>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lajoie, D. M., Roberts, S. A., Zobel-Thropp, P. A., Delahaye, J. L., Bandarian, V., Binford, G. J., & Cordes, M. H. J. (2015). Variable substrate preference among phospholipase D toxins from sicariid spiders. *Journal of Biological Chemistry*, 290(17), 10994-11007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.636951>
- Leal, H. G., de Oliveira Mendes, B. B. R., Horta, C. C. R., Pereira, N. B., Ferreira, D. S. M., da Silva, T. S., Biscoto, G. L., Kalapothakis, Y., Machado de Avila, R. A., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2020). Molecular cloning and functional characterization of recombinant Loxtox from *Loxosceles similis* venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1112-1123. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.190>

- Lee, S., & Lynch, K. R. (2005). Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochemical Journal*, 391(2), 317-323. <https://doi.org/10.1042/BJ20050043>
- Lim, S. H., Nowak-Sliwinska, P., Kamarulzaman, F. A., Van Den Bergh, H., Wagnières, G., & Lee, H. B. (2010). The neovessel occlusion efficacy of 151-hydroxypurpurin-7- lactone dimethyl ester induced with photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 86(2), 397-402. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00684.x>
- Lima, S. de A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Mendes, T. M., Luís, L. F., Oliveira, D., de Avila, R. A. M., Ferrer, V. P., Trevisan-Silva, D., Veiga, S. S., Minozzo, J. C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olortegui, C. (2018). Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00653>
- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133(3), 523-536. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.029>
- Lopes, P. H., Squaiella-Baptistão, C. C., Marques, M. O. T., & Tambourgi, D. V. (2020). Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. *Archives of Toxicology* 94(5), 1461-1477. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02719-0>
- Lozoya-Pérez, N. E., García-Carnero, L. C., Martínez-Álvarez, J. A., Martínez-Duncker, I., & Mora-Montes, H. M. (2021). *Tenebrio molitor* as an alternative model to analyze the *Sporothrix* species virulence. *Infection and Drug Resistance*, 14. <https://doi.org/10.2147/IDR.S312553>
- Luciano, M. N., Da Silva, P. H., Chaim, O. M., Dos Santos, V. L. P., Franco, C. R. C., Soares, M. F. S., Zanata, S. M., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2004). Experimental Evidence for a Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venom in Renal Tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(4). <https://doi.org/10.1177/002215540405200404>
- Machado, É. O., Álvares, É. S. S., De Maria, M., & Kalapothakis, E. (2005). Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana*, 6(2). <https://eurekamag.com/research/023/609/023609304.php>
- Machado, L. F., Laugesen, S., Botelho, E. D., Ricart, C. A. O., Fontes, W., Barbaro, K. C., Roepstorff, P., & Valle De Sousa, M. (2005). Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics*, 5(8), 2167-2176. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401096>
- Magalhães, G. S., Caporrino, M. C., Della-Casa, M. S., Kimura, L. F., Prezotto-Neto, J. P., Fukuda, D. A., Portes-Junior, J. A., Neves-Ferreira, A. G. C., Santoro, M. L., & Barbaro, K. C. (2013). Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie*, 95(9), 1773-1783. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.002>
- Mahal, K., Resch, M., Ficner, R., Schobert, R., Biersack, B., & Mueller, T. (2014). Effects of the tumor-vasculature-disrupting agent verubulin and two heteroaryl analogues on cancer cells,

endothelial cells, and blood vessels. *ChemMedChem*, 9(4) 847,854. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300531>

Málaque, C. M. S. A., Castro-Valencia, J. E., Cardoso, J. L. C., França, F. O. de S., Barbaro, K. C., & Fan, H. W. (2002). Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(3). <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000300005>

MARTINS, R., KNYSK, I., & BERTANI, R. (2002). A new species of *Loxosceles* of the laeta group from Brazil (Araneae: Sicariidae). *Zootaxa*, 94(1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.94.1.1>

Matsubara, F. H., Gremski, L. H., Meissner, G. O., Constantino Lopes, E. S., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2013). A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. *Toxicon*, 71, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.014>

Matsubara, F. H., Meissner, G. O., Herzig, V., Justa, H. C., Dias, B. C. L., Trevisan-Silva, D., Gremski, L. H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., King, G. F., & Veiga, S. S. (2017). Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. *Insect Molecular Biology*, 26(1), 25-34. <https://doi.org/10.1111/imb.12268>

Matsubara, F. H., Meissner, G. O., Herzig, V., Justa, H. C., Dias, B. C. L., Trevisan-Silva, D., Gremski, L. H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., King, G. F., & Veiga, S. S. (2017). Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. *Insect Molecular Biology*, 26(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/imb.12268>

Medina-Santos, R., Fernandes Costa, T. G., Silva de Assis, T. C., Kalapothakis, Y., de Almeida Lima, S., do Carmo, A. O., Gonzalez-Kozlova, E. E., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., & Guerra-Duarte, C. (2022). Analysis of NGS data from Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom gland reveals toxin diversity. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2022.101017>

Medina-Santos, R., Guerra-Duarte, C., de Almeida Lima, S., Costal-Oliveira, F., Alves de Aquino, P., Oliveira do Carmo, A., Ferreyra, C. B., Gonzalez-Kozlova, E. E., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2019). Diversity of astacin-like metalloproteases identified by transcriptomic analysis in Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom and in vitro activity characterization. *Biochimie*, 167, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.08.017>

Mehl, A. A., Schneider, B., Schneider, F. K., & De Carvalho, B. H. K. (2020). Measurement of wound area for early analysis of the scar predictive factor. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 28. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.3708.3299>

Meissner, G. O., de Resende Lara, P. T., Scott, L. P. B., Braz, A. S. K., Chaves-Moreira, D., Matsubara, F. H., Soares, E. M., Trevisan-Silva, D., Gremski, L. H., Veiga, S. S., & Chaim, O. M. (2016). Molecular cloning and in silico characterization of knottin peptide, U2-SCRTX-Lit2, from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom glands. *Journal of Molecular Modeling*, 22 196. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3067-0>

- Mello-Leitão, C. F. de. (1917). Notas arachnologicas. 5, Especies novas ou pouco conhecidas do Brasil. Brotéria (Ser. Zool.) 15, 74–102. <https://arachnids.myspecies.info/node/8878>
- Mello-Leitão, C. F. de. (1931). Arachnidos do Rio Grande do Sul. Boletim Biologico Rio de Janeiro, 17, 10–14. <https://www.gbif.org/species/5170692>
- Mello-Leitão, C. F. de. (1934). Especies brasileiras do genero *Loxosceles* Lowe. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 6, 69–73. <https://www.gbif.org/species/5170653>
- Merchant, M. L., Hinton, J. F., & Geren, C. R. (1997). Effect of hyperbaric oxygen on sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 56(3). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.335>
- Ministério da Saúde, Brasil - DATASUS (2025) - TabNet. Acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles*. Portal gov.br. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em 10/2025.
- Moenkhaus, W. J. (1898). Contribuição para o conhecimento das aranhas de S. Paulo. Revista do Museu Paulista, 3, 77–112. <https://www.periodicos.capes.gov.br/index.php/acervo/buscaador.html?task=detalhes&id=W2777270215>.
- Monteiro, C. L. B., Rubel, R., Cogo, L. L., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2002). Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): Enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. Toxicon, 40(4), 409-418. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00209-4).
- More, V., Muhsinah, A. Bin, Latha, G. S., Alhazmi, A. Y. M., Ibrahim, O. A., S. Binshaya, A., Mahnashi, M. H., Almasoudi, H. H., Gangadharappa, H., Maruthi, S. N., Rao, S., Janardhan, B., Khan, A. A., Muddapur, U. M., Shaikh, I. A., & More, S. S. (2022). Evaluation of Anti-Venom Potential of Areca catechu Seed Extract on *Bungarus caeruleus* Venom. Separations, 9(11). <https://doi.org/10.3390/separations9110360>
- Morgon, A. M., Belisario-Ferrari, M. R., Trevisan-Silva, D., Meissner, G. O., Vuitika, L., Marin, B., Tashima, A. K., Gremski, L. H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S. S., & Chaim, O. M. (2016). Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. Biochimie, 128–129, 8-19. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.003>
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature Methods, 5(7), 621-628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Mota, I., & Barbaro, K. C. (1995). Biological and biochemical properties of venoms from medically important *Loxosceles* (araneae) species in Brazil. Toxin Reviews, 14(3). <https://doi.org/10.3109/15569549509019471>
- Muntean, M., & Florea, A. (2025). Phospholipase A2 - A Significant Bio-Active Molecule in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Venom. Molecules, 30(12), 2623. <https://doi.org/10.3390/molecules30122623>

- Murakami, M., Sato, H., & Taketomi, Y. (2020). Updating phospholipase a2 biology. *Biomolecules* 10(10), 1457. <https://doi.org/10.3390/biom10101457>
- Murakami, M. T., Freitas Fernandes-Pedrosa, M., De Andrade, S. A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D. V., & Arni, R. K. (2006). Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(1), 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.123>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., & Pfaller, M. A. (2000). *Medical Microbiology*. American Society for Microbiology (3rd ed, p. 654–671).
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881), 1344-1349. <https://doi.org/10.1126/science.1158441>
- Narasimhan, L., Singh, J., Humblet, C., Guruprasad, K., & Blundell, T. (1994). Snail and spider toxins share a similar tertiary structure and “cystine motif”. *Nature Structural Biology*, 1(12), 850-852. <https://doi.org/10.1038/nsb1294-850>
- Nicholson, J. F., & Nicholson, B. H. (1962). Hemolytic anemia from brown spider bite, necrotic arachnidism. *The Journal of the Oklahoma State Medical Association*, 55. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14479462/>
- Norton, R. S., & Pallaghy, P. K. (1998). The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*, 36(11). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00149-4)
- Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* 17(4), 779-804. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9440-7>
- O'Donnell, V. B., Murphy, R. C., & Watson, S. P. (2014). Platelet lipidomics: Modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circulation Research* 114(7). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301597>
- Okamoto, C. K., van den Berg, C. W., Masashi, M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., & Tambourgi, D. V. (2017). Tetracycline reduces kidney damage induced by *Loxosceles* spider venom. *Toxins*, 9(3), 90. <https://doi.org/10.3390/toxins9030090>
- Okamoto, C. K., van den Berg, C. W., Pohl, P. C., & Tambourgi, D. V. (2024). Role of the complement system in kidney cell death induced by *Loxosceles* venom Sphingomyelinases D. *Archives of Toxicology*, 98(5), 1561-1572. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03711-8>
- Oliveira, L. S., Estevão-Costa, M. I., Alvarenga, V. G., Vivas-Ruiz, D. E., Yarleque, A., Lima, A. M., Cavaco, A., Eble, J. A., & Sanchez, E. F. (2019). Atroxlysin-III, A Metalloproteinase from the Venom of the Peruvian Pit Viper Snake *Bothrops atrox* (Jergón) Induces Glycoprotein VI Shedding and Impairs Platelet Function. *Molecules* 24(19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193489>
- Oliveira-Mendes, B. B. R. de, Chatzaki, M., Sales-Medina, D. F., Leal, H. G., van der Veer, R., Biscoto, G. L., Gonçalves, P. M., Soares da Silva, T., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E., & Horta, C. C. R. (2020). From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom:

An overview focused on *Loxosceles similis*. *Toxicon* 173(15).  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.11.002>

Olivo, M., & Chin, W. L. W. (2006). Perylenequinones in photodynamic therapy: Cellular versus vascular response. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25(1–2). <https://doi.org/10.1615/jenvironpatholtoxiconcol.v25.i1-2.140>

Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estévez, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Vázquez, H., Zavaleta, A., Salas Arruz, M., Stock, R. P., & Alagón, A. (2006). North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon*, 48(1), 64–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.010>

Paixão-Cavalcante, D., Van Den Berg, C. W., De Freitas Fernandes-Pedrosa, M., Gonçalves De Andrade, R. M., & Tambourgi, D. V. (2006). Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 61–68. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700049>

Paixão-Cavalcante, D., Van Den Berg, C. W., Gonçalves-De-Andrade, R. M., Fernandes-Pedrosa, M. D. F., Okamoto, C. K., & Tambourgi, D. V. (2007). Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(6), 1410–1418. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700688>

Pallaghy, P. K., Norton, R. S., Nielsen, K. J., & Craik, D. J. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded  $\beta$ -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Science*, 3(10), 1833–1839. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031022>

Parks, T. N., Mueller, A. L., Artman, L. D., Albensi, B. C., Nemeth, E. F., Jackson, H., Jasys, V. J., Saccomano, N. A., & Volkmann, R. A. (1991). Arylamine toxins from funnel-web spider (*Agelenopsis aperta*) venom antagonize N-methyl-D-aspartate receptor function in mammalian brain. *Journal of Biological Chemistry*, 32(15), 21523–21529. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)54670-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54670-6)

Pegaz, B., Debefve, E., Ballini, J. P., Wagnières, G., Spaniol, S., Albrecht, V., Scheglmann, D. V., Nifantiev, N. E., Van Den Bergh, H., & Konan-Kouakou, Y. N. (2006). Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1–2), 134–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.01.008>

Penaforte, C. L., Prado, V. F., Prado, M. A. M., Romano-Silva, M. A., Guimarães, P. E. M., De Marco, L., Gomez, M. V., & Kalapothakis, E. (2000). Molecular cloning of cDNAs encoding insecticidal neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, 38(10), 1443–1449. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00237-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00237-8)

Pereira, N. B., Campos, P. P., de Jesus Oviedo Socarrás, T., Pimenta, T. S., Parreiras, P. M., Silva, S. S., Kalapothakis, E., Andrade, S. P., & Moro, L. (2012). Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. *Toxicon*, 59(7–8), 672–679.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.005>

Pereira, N. B., Campos, P. P., Parreiras, P. M., Chiarini-Garcia, H., Socarrás, T. O., Kalapothakis, E., Andrade, S. P., & Moro, L. (2014). Apoptosis, mast cell degranulation and

collagen breakdown in the pathogenesis of loxoscelism in subcutaneously implanted sponges. *Toxicon*, 84, 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.03.003>

Polli, N. L. C., Ferreira, M. E. de F., Schluga, P. H. C., Antunes, B. C., Justa, H. C. da, Theodoro, J. L., Zazula, M. F., Naliwaiko, K., Minozzo, J. C., Senff-Ribeiro, A., Wille, A. C. M., Veiga, S. S., & Gremski, L. H. (2024). Novel insights into the application of recombinant mutated phospholipases D as antigens for developing new strategies against Loxoscelism. *Acta Tropica*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107354>

Polli, N. L. C., Justa, H. C. da, Antunes, B. C., Silva, T. P. da, Dittrich, R. L., de Souza, G. S., Wille, A. C. M., Matsubara, F. H., Minozzo, J. C., Mariutti, R. B., Arni, R. K., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S. S., & Gremski, L. H. (2021). A protective vaccine against the toxic activities following Brown spider accidents based on recombinant mutated phospholipases D as antigens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 757-770. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.005>

Qiu, T., Xie, P., Liu, Y., Li, G., Xiong, Q., Hao, L., & Li, H. (2009). The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat. *Toxicology*, 257(1-2), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.12.012>

Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Schwartz, E. F., Becerril, B., Corzo, G., & Possani, L. D. (2011). Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression. *Toxicon* 58(8), 644, 663. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.015>

Magalhães, R.S., dos Santos, A. M. G., Araújo, A.N.S., Damásio, P. L.P., Alvarenga, V. G., Oliveira, L. S., Sanchez, E. F., Olórtogui, C. C., Varela, L. S. R. N., Paiva, AL.B., & Duarte, C.G. (2024). Venom from *Loxosceles* Spiders Collected in Southeastern and Northeastern Brazilian Regions Cause Hemotoxic Effects on Human Blood Components. *Toxins* 16(12), 532. <https://doi.org/10.3390/toxins16120532>

Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G. V., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., & Stock, R. P. (2004). Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*, 44(5). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.06.013>

Rees, R. S., O'Leary, J. P., & King, L. E. (1983). The pathogenesis of systemic loxoscelism following brown recluse spider bites. *Journal of Surgical Research*, 35(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(83\)90119-1](https://doi.org/10.1016/0022-4804(83)90119-1)

Ren, X., Dai, M., Lin, L. P., Li, P. K., & Ding, J. (2009). Anti-angiogenic and vascular disrupting effects of C9, a new microtubule-depolymerizing agent. *British Journal of Pharmacology*, 156(8), 1228-1238. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00112.x>

Ríos, J. C., Pérez, M., Sánchez, P., Bettini, M., Mieres, J. J., & Paris, E. (2007). Prevalence and epidemiology of *Loxosceles laeta* bite. Analysis of consultations to a poison control center. *Revista medica de Chile*, 135(9). [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872007000900010&lng=en](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872007000900010&lng=en)

Rodrigues, E. N. L., & Dornelles, J. E. F. (2003). Confirmação da ocorrência de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) e *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae; Sicariidae) no

município de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência e Natura*, 25(25), 71. <https://doi.org/10.5902/2179460X27238>

Roy, H. E., & Pell, J. K. (2000). Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. *Em Biocontrol Science and Technology* 10(6), 737-752. <https://doi.org/10.1080/09583150020011708>

Sade, Y. B., Bóia-Ferreira, M., Gremski, L. H., Da Silveira, R. B., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2012). Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(1), 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.013>

Sanchez, E. F., Richardson, M., Gremski, L. H., Veiga, S. S., Yarleque, A., Niland, S., Lima, A. M., Estevao-Costa, M. I., & Eble, J. A. (2016). A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(3), 542-556. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.021>

Scheel, J., Heppenheimer, A., Lehringer, E., Kreutz, J., Poth, A., Ammann, H., Reisinger, K., & Banduhn, N. (2011). Classification and labeling of industrial products with extreme pH by making use of in vitro methods for the assessment of skin and eye irritation and corrosion in a weight of evidence approach. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1435-1447. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.017>

Schenone F, H. (2003). Toxic pictures produced by spider bites in Chile: Latrodectism and loxoscelism. *Revista Medica de Chile* 131(4), 437-444. [https://scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872003000400013&lng=en](https://scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872003000400013&lng=en)

Secretária de Vigilância em Saúde, M. da S. (2022). Panorama dos acidentes causados por aranhas no Brasil, de 2017 a 2021. *Boletim Epidemiológico*, 53. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude-5a-edicao-revisada-e-atualizada-2022/view>

Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O. M., Gremski, L. H., Paludo, K. S., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O. C., & Veiga, S. S. (2008). Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles genus*) venom toxins. *Biotechnology Advances* 26(3). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.003>

Sezerino, U. M., Zannin, M., Coelho, L. K., Gonçalves, J., Grando, M., Mattosinho, S. G., Cardoso, J. L. C., Von Eickstedt, V. R., França, F. O. S., Barbaro, K. C., & Fan, H. W. (1998). A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(5), 546-548. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90909-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90909-9)

Shimokawa-Falcão, L. H. A. L., Caporrino, M. C., Barbaro, K. C., Della-Casa, M. S., & Magalhães, G. S. (2017). Toxin fused with SUMO tag: A new expression vector strategy to obtain recombinant venom toxins with easy tag removal inside the bacteria. *Toxins*, 9(3), 82. <https://doi.org/10.3390/toxins9030082>

- Silvestre, F. G., Castro, C. S. D., Moura, J. F. D., Giusta, M. S., Maria, M. De, Álvares, É. S. S., Lobato, F. C. F., Assis, R. A., Gonçalves, L. A., Gubert, I. C., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2005). Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon*, 46(8), 927-936. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.002>
- Sin Singer, S., Pilate, V. J., Rodriguez de souza, A., & Sin Singer, A. (2011). Registros de acidentes causados por aranha-marrom *Loxosceles* (Araneae , Sicariidae ) em Juiz de Fora e Rio Novo , Minas Gerais. *APS*, 14(1). <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-593773>
- Slodownik, D., Grinberg, I., Spira, R. M., Skornik, Y., & Goldstein, R. S. (2009). The human skin/chick chorioallantoic membrane model accurately predicts the potency of cosmetic allergens. *Experimental Dermatology*, 18(4). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00803.x>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- SOUZA, M. F. V. R., & FERREIRA, R. L. (2018). A new highly troglomorphic *Loxosceles* (Araneae: Sicariidae) from Brazil. *Zootaxa*, 4438(3), 575-587. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4438.3.9>
- Stern, R., & Jedrzejewski, M. J. (2006). Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical Reviews* 106(3), 818-839. <https://doi.org/10.1021/cr050247k>
- Stöcker, W., Grams, F., Reinemer, P., Bode, W., Baumann, U., Gomis-Rüth, F. -X, & McKay, D. B. (1995). The metzincins — Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. *Em Protein Science* 4(5), 823-840. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040502>
- Swanson, D. L., & Vetter, R. S. (2005). Bites of Brown Recluse Spiders and Suspected Necrotic Arachnidism. *New England Journal of Medicine*, 352(7). <https://doi.org/10.1056/nejmra041184>
- Tambourgi, D. V., Gonçalves-de-Andrade, R. M., & van den Berg, C. W. (2010). Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon* 56(7), 1113-1119. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>
- Tambourgi, D. V., Magnoli, F. C., Van Den Berg, C. W., Morgan, B. P., De Araujo, P. S., Alves, E. W., & Da Silva, W. D. (1998). Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(1), 366-373. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9474>
- Tambourgi, D. V., Paixão-Cavalcante, D., Gonçalves De Andrade, R. M., Fernandes-Pedrosa, M. D. F., Magnoli, F. C., Morgan, B. P., & Van Den Berg, C. W. (2005). *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and

endogenous gelatinase expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(4), 725-731. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23654.x>

Tambourgi, D. V., Pedrosa, M. D. F. F., Van Den Berg, C. W., Gonçalves-De-Andrade, R. M., Ferracini, M., Paixão-Cavalcante, D., Morgan, B. P., & Rushmere, N. K. (2004). Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Molecular Immunology*, 41(8), 831-840. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.027>

Tambourgi, D. V., Petricevich, V. L., Magnoli, F. C., Assaf, S. L. M. R., Jancar, S., & Dias Da Silva, W. (1998). Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: Pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon*, 36(2), 391-403. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00063-9)

Thomas, S. G. (2019). The structure of resting and activated platelets. *Platelets*, 47-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00003-5>

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Trajano, E., & Gnaspini-Netto, P. (1990). Composição da fauna cavernícola brasileira, com uma análise preliminar da distribuição dos taxons. *Revista Brasileira de Zoologia*, 7(3). <https://doi.org/10.1590/s0101-81751990000300017>

Trevisan-Silva, D., Bednaski, A. V., Gremski, L. H., Chaim, O. M., Veiga, S. S., & Senff-Ribeiro, A. (2013). Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. *Toxicon*, 76, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.065>

Trevisan-Silva, D., Gremski, L. H., Chaim, O. M., da Silveira, R. B., Meissner, G. O., Mangili, O. C., Barbaro, K. C., Gremski, W., Veiga, S. S., & Senff-Ribeiro, A. (2010). Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie*, 92(1), 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.10.003>

Tutrone, W. D., Green, K. M., Norris, T., Weinberg, J. M., & Clarke, D. (2005). Brown recluse spider envenomation: dermatologic application of hyperbaric oxygen therapy. *Journal of drugs in dermatology : JDD* 4(4), 424-428. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16004015/>

V., D., Pidde-Queiroz, G., M., R., K., C., J., T., de Oliveira, P. S. L., T., M., & den Berg, C. W. van. (2011). Molecular Cloning, Expression, Function, Structure and Immunoreactivities of a Sphingomyelinase D from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian Brown Spider from Karstic Areas. *Molecular Cloning - Selected Applications in Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.5772/24357>

Van Meeteren, L. A., Frederiks, F., Giepmans, B. N. G., Fernandes Pedrosa, M. F., Billington, S. J., Jost, B. H., Tambourgi, D. V., & Moolenaar, W. H. (2004). Spider and Bacterial Sphingomyelinases D Target Cellular Lysophosphatidic Acid Receptors by Hydrolyzing

Lysophosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 10833-10836. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300563200>

Veiga, S. S., da Silveira, R. B., Dreyfuss, J. L., Haoach, J., Pereira, A. M., Mangili, O. C., & Gremski, W. (2000). Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, 38(6), 825–839. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00197-X)

Veiga, S. S., Zanetti, V. C., Franco, C. R. C., Trindade, E. S., Porcionatto, M. A., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., & Nader, H. B. (2001). *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thrombosis Research*, 102(3). [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00254-7)

Vetter, R. S. (2009). Arachnids misidentified as brown recluse spiders by medical personnel and other authorities in North America. *Toxicon*, 54(4), 545-547. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.04.021>

Vetter, R. S., & Isbister, G. K. (2008). Medical aspects of spider bites. *Annual Review of Entomology* 53, 409-429. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093503>

Vuitika, L., Gremski, L. H., Belisário-Ferrari, M. R., Chaves-Moreira, D., Ferrer, V. P., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2013). Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(11), 2479-2492. <https://doi.org/10.1002/jcb.24594>

W. J. Moenkhaus. (1898). O conhecimento das aranhas de São Paulo. *Rev. Mus. Paulista*, 3, 77–112. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.12292>

Wang, Y., Xue, W., Pustovalova, M., Kuzmin, D. V, & Leonov, S. (2025). Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) Model for Cancer Studies and Drug Evaluation. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 30(5). <https://doi.org/10.31083/FBL37456>

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Em Nature Reviews Genetics* 10(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>

Wasserman, G. S., & Anderson, P. C. (1983). Loxoscelism and necrotic arachnidism. *Clinical Toxicology*, 21(4–5). <https://doi.org/10.3109/15563658308990434>

Williams, S. T., Khare, V. K., Johnston, G. A., & Blackall, D. P. (1995). Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation: A report of two cases and review of the literature. *American Journal of Clinical Pathology*, 104(4). <https://doi.org/10.1093/ajcp/104.4.463>

Wise, D. H. (1993). Spiders in ecological webs. *Spiders in ecological webs*. <https://doi.org/10.2307/3495520>

World Spider Catalog (2025). ([s.d.]). World Spider Catalog. Version 26. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, accessed on {24/10/2025}. doi: 10.24436/2.

Wright, R. P., Elgert, K. D., Campbell, B. J., & Barrett, J. T. (1973). Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159(1), 415-426. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90469-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90469-4)

Wu, W. B., Chang, S. C., Liao, M. Y., & Huang, T. F. (2001). Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. *Biochemical Journal*, 357(3), 719-728. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570719>

Yan Kalapothakis, & Evanguedes Kalapothakis. (2021). Novos componentes do veneno de *Tityus serrulatus*: uma abordagem transcriptômica [Dissertação de Mestrado]. UFMG. Disponível em: <https://www.pggenetica.icb.ufmg.br/diss.php>

Young, A. R., & Pincus, S. J. (2001). Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*, 39(2-3), 391-400. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00145-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00145-8)

Yurchenco, P. D. (2011). Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004911>

Zanetti, V. C., Da Silveira, R. B., Dreyfuss, J. L., Haoach, J., Mangili, O. C., Veiga, S. S., & Gremski, W. (2002). Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 13(2), 135-148. <https://doi.org/10.1097/00001721-200203000-00009>

Zeeshan Bhatti, M., & Karim, A. (2021). Plant Natural Products: A Promising Source of Hyaluronidase Enzyme Inhibitors. *Inten Chopen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98814>

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Em Biocontrol Science and Technology* 17(6), 553-596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>

Zimmermann, L., Morado-Díaz, C. J., Davis-López de Carrizosa, M. A., de la Cruz, R. R., May, P. J., Streicher, J., Pastor, Á. M., & Blumer, R. (2013). Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features. *Journal of Neuroscience*, 33(7), 2784-2793. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4116-12.2013>

Zobel-Thropp, P. A., Kerins, A. E., & Binford, G. J. (2012). Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. *Toxicon*, 60(3), 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.350>

## ANEXO I - Sequências das Loxtox previamente caracterizadas

Família + Proteína ID	Sequência de aminoácidos
s1A (ANY30960.1)	MLLHIALILGCWSALSEG <sup>A</sup> QTEVGERADKRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNSLAQIDEFVNLGSNSI <sup>E</sup> T <sup>D</sup> VSF <sup>D</sup> QANPEYTY <sup>E</sup> G I <sup>PCDC</sup> GRSCTHSTNFNDFLKGRLKATTPGDSKYHEKLI <sup>L</sup> VVFDLKTGSLYDNQAYDAGTKLAKNLLQHYWNNNGN GGRAYI <sup>I</sup> LSIPNLNHYKLI <sup>T</sup> GFKETLKNEGHEELLEKVGHDFSGNDDISDVQKTYNKAGVTGHVWQSDGITNCLL RGLTRVKA <sup>A</sup> AVANRDSGSGI <sup>I</sup> INKVY <sup>Y</sup> TVDKRAT <sup>R</sup> TRDSLDAKVDG <sup>V</sup> MTNY <sup>N</sup> PDV <sup>I</sup> IVDLNEDAY <sup>K</sup> KNFRVAT <sup>F</sup> YEDNP WET <sup>F</sup> KE  MLLHIALILSCWSALSEG <sup>A</sup> QTNVGERAYKRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNSIAQIDEFVNLGSNSI <sup>E</sup> T <sup>D</sup> VSF <sup>D</sup> KKANPEYTY <sup>E</sup> G I <sup>PCDC</sup> GRNCLRWEIFNEFLKGLRATTPGNSKYHKKLI <sup>L</sup> VVFDLKTGSLYDDQAHVAGTKLADNLLQHYWNNNGN GGKAYI <sup>I</sup> LSIPN <sup>T</sup> K <sup>H</sup> YKLI <sup>K</sup> GFKETLKNEGHEKLLK <sup>V</sup> GYDFSGNDNIT <sup>I</sup> DIQ <sup>T</sup> KYKAGVTGHVWQSDGITNCLL RGFTRVNA <sup>A</sup> AVAKRDSAD <sup>E</sup> FINKVY <sup>Y</sup> TVDRRAT <sup>R</sup> TRSLDAKVDG <sup>V</sup> IMTNY <sup>N</sup> PDV <sup>I</sup> ADVLNEDAY <sup>K</sup> KNFRVAT <sup>F</sup> YRDNP WKT <sup>F</sup> KN
s1B (ANY30961.1)	MLLHIALILSCWSALSEG <sup>A</sup> QTDVEERADNRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNNLKQIDEFVNLGSNAI <sup>E</sup> T <sup>D</sup> VSF <sup>D</sup> QANPEYTY <sup>E</sup> G I <sup>PCDC</sup> GRSCTHSTNFNDFLKGRLKATTPGDSKYHEKLI <sup>L</sup> VVFDLKTGSLYDNQAYDAGTKLAKNLLQHYWNNNGN GGRAYI <sup>I</sup> LSIPNLNHYKLI <sup>T</sup> GFQ <sup>T</sup> LKDEGHEELLEKVG <sup>Y</sup> DFSGNDDISDVQKTYNKAGVTGHVWQSDGITNCLL RTLTRVKA <sup>A</sup> AVANRDSGSGI <sup>I</sup> INKVY <sup>Y</sup> TVDKRAT <sup>R</sup> TRDSLDAKVDG <sup>V</sup> MTNY <sup>N</sup> PDV <sup>I</sup> IVDLNEDAY <sup>K</sup> KNFRVAT <sup>F</sup> YEDNP WET <sup>F</sup> KE
s1C (ANY30962.1)	MLLHIALILSCWSALSEG <sup>A</sup> QTDVEERADNRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNNLKQIDEFVNLGSNAI <sup>E</sup> S <sup>D</sup> VSF <sup>D</sup> KKANPEYTY <sup>E</sup> G T <sup>PCDC</sup> GRDCLRWEIFNEFVKGLRATTPGDSKYHEKLI <sup>L</sup> VVFDLKTGSLYDQASDAGTKLAKSLLQNYWNNNGN GGRAYI <sup>I</sup> LSIPNLNHYKLI <sup>T</sup> GFQ <sup>T</sup> LKDEGHEELLEKVG <sup>Y</sup> DFSGNDDISDVQKTYNKAGVTGHVWQSDGITNCLL RTLTRVKA <sup>A</sup> AVANRDSGSGI <sup>I</sup> INKVY <sup>Y</sup> TVDKRAT <sup>R</sup> TRDSLDAKVDG <sup>V</sup> IMTNY <sup>N</sup> PDV <sup>I</sup> ADVLNEAAYK <sup>T</sup> KFRLAT <sup>F</sup> YEDNP WET <sup>F</sup> KE
s1D (ANY30963.1)	MLLHIVLVLSWGWALSEG <sup>A</sup> TENDVGERADKRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNSIAQIDEFVNLGSNSI <sup>E</sup> T <sup>D</sup> VSF <sup>D</sup> DSANPEYTY <sup>E</sup> G I <sup>PCDC</sup> GRACLHWEYFNDFLKGRLKATTPGDSKYHKKLI <sup>L</sup> VVFDLKTGSLYDNQAYDAGK <sup>L</sup> LAKNLLKHYWNNNGN GGRAYI <sup>I</sup> LSIPNLNHYKLI <sup>T</sup> GFKETLKKEGHEELLEKVG <sup>Y</sup> DFSGNDDISDVQKTYKAGVTGHVWQSDGITNCLL RGLTRVKA <sup>A</sup> AVANRDSGSGI <sup>I</sup> INKVY <sup>Y</sup> TVDKRAT <sup>R</sup> TRDSLDAKVDG <sup>V</sup> IMTNY <sup>N</sup> PDV <sup>I</sup> ITDVLNEAAY <sup>K</sup> KKFRIAT <sup>F</sup> YEDNP WET <sup>F</sup> KE
s1E_parcial (ANY30964.1)	MLLNVAVLLSCWSALSEA <sup>V</sup> QTDVGERADQRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNAISQIDEFVNLGANSI <sup>E</sup> T <sup>D</sup> VAF <sup>D</sup> QANPEYTH <sup>E</sup> G V <sup>PCDC</sup> GRNCRKKEKFTDFVKALRSSTTPGDSKYQEKLI <sup>L</sup> VVFDLKTGSLKDNQAYDAGTKLAKNLLQHYWNNNGN GGRSYIVLSIPYLTHYKLI <sup>T</sup> GFQ <sup>T</sup> LKTEGHEELLEKVG <sup>Y</sup> DFSRNDYISDVKAAYNRAGVTGHVWQSDGVTNCWL RGFGRVKEAVANRDSAD <sup>G</sup> FINKVY <sup>Y</sup> TVDKRAT <sup>R</sup> TRKSLNAGVDG <sup>V</sup> IMTNY <sup>N</sup> PDV <sup>I</sup> ADVLNEAAY <sup>K</sup> T
s1F_parcial (ANY30965.1)	PEYTYHGI <sup>I</sup> PCDCGRNCLRWEIFNEFLKGLRATTPGNSKYHKKLI <sup>L</sup> VVFDLKTGSLYDDQAHVAGTKLADNLLQH YWNNNGGKAYI <sup>I</sup> LSIPN <sup>T</sup> K <sup>H</sup> YKLI <sup>K</sup> GFKETLKNEGHEKLLK <sup>V</sup> GYDFSGNDNIT <sup>I</sup> DIQ <sup>T</sup> KYKAGVTGHVWQSD GITNCLL <sup>L</sup> RGFTRVNA <sup>A</sup> AVAKRDSAD <sup>E</sup> FINKVY <sup>Y</sup>
s1G_parcial (ANY30966.1)	ATQTDVEERADNRRPIWIMGHMVNNLKQIDEFVNLGSNAI <sup>E</sup> SDV <sup>S</sup> FDK <sup>K</sup> ANPEYTYH <sup>G</sup> T <sup>P</sup>
s2A (ANY30967.1)	MLLHVVLILGCWSILSEG <sup>A</sup> ENDVAERDDDKRPIWNMA <sup>E</sup> MVNSIAQIQEFMRLGSNSL <sup>E</sup> F <sup>D</sup> INFDKDAKPVYTY <sup>E</sup> G V <sup>PCDC</sup> FRSCLYWEYIGDYLTALRETT <sup>P</sup> GNPKYRENLSLLVFDLKTNSLYDSQAAEAGRNLADDIFKYWNEGNN GGRAYMI <sup>I</sup> LSIPNLEHYDLITAFKHKFTSNGHEDLLDYVGFDF <sup>S</sup> SANDNIPDVERVFEKVKVSGVPDRVWQSDGITN CIARSLDRVKEAVKERDAGGI <sup>I</sup> INKIYV <sup>Y</sup> TLDK <sup>V</sup> SSIKEALDAGVDG <sup>V</sup> MTNHPDVVGV <sup>L</sup> REDAYKTKFRYASYS NPWET <sup>F</sup> KAE
s2B (ANY30968.1)	MFLHIALTLGCWSIFSEG <sup>A</sup> ETDVAERDDTRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNSIGQIDEFMRLGSNSL <sup>E</sup> F <sup>D</sup> INFDKDAKPVYTY <sup>E</sup> G V <sup>PCDC</sup> FRSCLYWEYIGDYLTALRETT <sup>P</sup> GNPKYRENLSLLVFDLKTNSLYDSQAAEAGRNLADDIFKYWNEGNN GGRAYMI <sup>I</sup> LSIPNLEHYDLITAFKHKFTSNGHEDLLDYVGFDF <sup>S</sup> SANDNIPDVERVFEKVKVSGVPDRVWQSDGITN CIARSLDRVKEAVKERDAGGI <sup>I</sup> INKIYV <sup>Y</sup> TLDK <sup>V</sup> SSIKEALDAGVDG <sup>V</sup> MTNHPDVVGV <sup>L</sup> REDAYKTKFRYASYS NPWET <sup>F</sup> KAE
s2C (ANY30969.1)	MFLHIALTLGCWSIFSEG <sup>A</sup> ETDVAERVDTRRPIWIMG <sup>E</sup> MVNSIGQIDEFMRLGSNSL <sup>E</sup> F <sup>D</sup> INFDKDAKPVYTY <sup>E</sup> G V <sup>PCDC</sup> FRSCLYWEYIGDYLTALRETT <sup>P</sup> GNPKYRENLSLLVFDLKTNSLYDSQAAEAGRNLADDIFKYWNEGNN GGRAYMI <sup>I</sup> LSIPNLEHYDLITAFKHKFTSNGHEDLLDYVGFDF <sup>S</sup> SANDNIPDVERVFEKVKVSGVPDRVWQSDGITN CIARSLDRVKEAVKERDAGGI <sup>I</sup> INKIYV <sup>Y</sup> TLDK <sup>V</sup> SSIKEALDAGVDG <sup>V</sup> MTNHPDVVGV <sup>L</sup> REDAYKTKFRYASYS NPWET <sup>F</sup> KAE
s3A (ANY30970.1)	MLLHVVLILGCWSILSEG <sup>A</sup> ENDVAERDDDKRPIWNMA <sup>E</sup> MVNSIAQIQEFVALGANSI <sup>E</sup> T <sup>D</sup> ISFDKNADPEYTY <sup>E</sup> G V <sup>PCDC</sup> FRNCMNWEHATHFEGLRNATLPGNPKFKERLVLVFDLKSNGLQHQDEQAYDAGKRLAIKLLRHYWNFGE DGGRAYIVLSVPLVKHYKFLGFRDTMFLNGHEKLEKVGHDFSGNDDISDIVEGYSRAEVTEH <sup>I</sup> WQSDGITNCI YRGYDRIKQCVNARDSGNLINKVY <sup>Y</sup> TADKASTIRGALDEGVDG <sup>V</sup> IMTNPNNVNDVLKEDAYSSKFRYANIDNP WLT <sup>I</sup> KK

<p>s4A (ANY30971.1)</p>	<p>MLCAIALIFCFWATGLEGAETEVEMERADRRRPIWNMGEMVNEIYQIDEFVDLGANSIETDITFGDDAMAAYSFG VPCDCRRWCHKWEYVNTFFLEGLRATTPGDSKYRKEKELIVVFDLKTGDLSSSSAYKGGRLFAEKLLRHYWNGGSN GGRAYIIISIPDIDHHAFLGFRDFLAKSGHEDLLAKVGYDFSGNDDLQIRRTALHKGGVGDREHVWQSDGITNC ILRSLDRVNKAVSNRSDSTNGYINKVYVTVTERRYVSRDALDAEVDGIMTNYPDVIVNVLKENNYKNRFKMATYED NPWVLFKR</p>
<p>s5A (ANY30972.1)</p>	<p>MYVHLALILGCWTIILQSGSEADIVQRADNRRPIWNMGEMVNAVAQINTFLDLGSNALEMIDITFNKQAMPVYTYG TFCDCLRDCLRWEYFSTFVQELRQRTTPGDAKYRQQLILLIFDLKTGSINNNQARTAGINMAQQLLQHYWNNNGN GGRAYIVLSIPYLEHYELVRGFRDTRGEGQERLLEKVGDFSGRHLSSIGEAYKAGVNGHVWQSDGITNCLP LVDDLPRVREAVNRDSSNGFINKVYVTVDKVSTTKKALSAGVDGIMTNKPSVIVDVNESGIRDKYRLATYED NPWETFNR</p>
<p>s6A (ANY30973.1)</p>	<p>MLLKYLFLAFGIIISQVAASAPYNATNDLKPIMWGMVNAISQIKEFLNLGANSLEFDIAFDSQAKAQYTYGK MPCDCFRVCAKWEYISSYLSIREVTTTGNPKLSTDLILLIDDLKIDWMSGGQSYVAGGDMASKLLDYYWQRKMT SGRAYIVLSIPDIKNGYFIRGFRKQLQSEGYFDQYKDKIGYDFSGNEHLSIRKALQRAVTEHVWQSDGVSNCF ARSTARLKKALNRDSPGGYINKIYVTVDKYSTMRKASLGVGVMTNHPNANFVLGEGAFRDKFRPAYEDI PW</p>
<p>s6B (ANY30974.1)</p>	<p>MGHMVNSIYQINEFLDLGSNALEIDITYDSQAKAQYTYHKAFCDCFRVCGRWEYISRYLNEIREVTALGNPKFRE QLILLILDMKIDWMTDAQSVVAAGGDIASKLLDYYWQRNTSSGRAYIILSMPSVRNYCFIRGFRAKLQSEGYEK YKKEKIGYEFSGNEDLDSIHQALQRAVSEHVWQSDGITNCVPRGTGRLEKALMNRESPTGYIDKVFWTIDLPS IEHILRLGVVDGIMTNNPDRVNTALKRTRFRPAVYDDNPWT</p>
<p>s7A (ANY30975.1)</p>	<p>MLFLVFRFLCCWILILQGAEDVSEMGENRRPIWNARTVNAEYPIDMFLEDDANPIGIAEFLDFGANALQIEVM FSSSGTAQSVSRKSFCDCSRTCVKWIDFSYLLDRLRHTTPDDSMFREELVLIIVLDLKVSDFNPSLSFKAGKDLA QKLLDHYWQKESGARAYILLSVPSTKNAALIRAFNLTLQKGEFAFFGKVGIDISGDDDLFSVRRIVERLGMTG WHVWQSDVITNCLLREKSQLREAVEERDSQGYMKNVYTLTADRHATIRNALRAGVDGVMNPNHLLDVLKETEF KDKFKLATYDDSPWETYMEDTEYISNTLNVDDISIAKK</p>
<p>s8A (ANY30976.1)</p>	<p>MSFTTAISLLVLSIVLQOQTQVAVDSRRPFWNIAEMVNAIDQIEPFLKRGANAIEFDIEFDSEGIAQQTHHG FCDCGRICNRKDDFVKYLDHIRQVTPSPGKEYREQLILLALDLKLRISVNLAYAGTDIANKLIDHYWKRGNST ARAYILLNIPSIHFDFINGFKHTIIRREGYERYDDKYGINFTGNDLELRLMLGRMNITYNIWQADGITSCLP RGTRRLKEAIRRDTEGYKFIYKVSITLVAYSTMRRSMRLSVDGIMSNHPERVVYILGEGYFANFRMATLEDN PWQKYHV</p>
<p>s8B (ANY30977.1)</p>	<p>MLFGITLCLAGLSVAIKGAEISSAERDDTRRPFYNIAEMVNGIVQINQFLDKGANAIIEFDIEFDANGTAQHTHG FCDCGRKCFHKENVTEYLDHIRQVTPGDPFLREQLVLLALDLKLRIDSQNSHTAGVDVAKKLLDHYWQRGKS KARAYLLNLPLEDEYEFVRGFKETLKDEGEQYNDVTGINFTGNEDLKTREVYEKLSVSSHIWQSDGITSCLP WGTRKRLTEILKLRNDPYNVTVKVPITIRYSIIRRSRLDVDGIGTNPDRVIEVLKEEFASKFRLATYEDD PWKKFIRI</p>
<p>s8C (ANY30978.1)</p>	<p>MLFGIALCIVGLSFVIKGAEISSVERDDTRRPFYNIAEMVNGIVQINQFLDKGANAIIEFDIEFDANGTAQHTHG FCDCGRKCFHKENVTEYLNHIRQVTPGDPFLYREQLVLLAVDLKLRIDSQKSHTAGVDVAKKLLDHYWQRGKS KARAYLLNLPLEDEYEFVRGFKETLKDEGEQYNDVTGINFTGNEDLKTREVYEELNVNSHIWQSDGITSCLP RRTRKLEKVLKLRNDPNYVTVKVPITIVRYTIIRRSRLDVDGIGTNPDRVIEVLKEEFASKFRLATYEDD PWKKFIRI</p>
<p>s9A (ANY30979.1)</p>	<p>MLLRILYFVCLVQYKIVSGAAEKDVIERDDGRRPVWNIAEMTNDIEIVKTYLDDGANALEFDIEFNERGQPL RTYGVFCDCCRKCGRTETFTSTFMDQMRKFTTPGDPFREFKLVLLMLDLKVKDFDSSSLAELAGQNIKAVLLDSY QRKADTRAYIVLSIPSLDYAKLIRGFYNEVKKQNFPTYRRRVGVDFSGNDDLDTRRALERVNITRRIWQSDGI TNCLPRGTGRLAAAIKRRDDPEYRFINKVYVSVDRKSTIRTVLDLEADGMITNFPDNFASVNLNESKYASRFLA NYMDNPWKKFIPSGSRMIQEKSLERISQLDAEEFTDNTLAPKSNFLIPELTELFFSCGGKGLF</p>
<p>s9B_parcial (ANY30980.1)</p>	<p>FDPDNFASVNLNESKYASRFLANYMDNPWKKFIPSGSRMIQEKSLERISQLDTEEFTDNTLAPKSNFLIPELTEL FFSCAPSFNYKTIITLTYNTLVLPITTHCLLWINTSNTNLHCIQITKNRIY</p>
<p>s10A (ANY30981.1)</p>	<p>MWLAIVLCLAGSAVLEGAEDTRERGDGRRPIWNIAEMVNDKEIIDKFLNNGANSVSESDVSFDSNGRPEKMHG APCDCGRKCDRQMSFDDYVDYMRQLTTPGDPKPFRESLVLIMFDFKLSLSSSVAYAGQEVLRMLDNYWKRGES GGRAYIVLSIPTIKRITFATGFYDKLHSEGFQYRDKVGI DFSGNEDLDETRILQSSNIVDHIWQSDGITNCLF RVMTRLKKAISKRDSNGYMKVYTVSVDKYTTMRKALRVAADGMITNFPARLVSVLNESEFSGKFRLATYDDNPW ERYSS</p>
<p>s10B (ANY30982.1)</p>	<p>MWLAIVLCLAGSAVLEGAEDTRERGDGRRPIWNIAEMVNDKEIIDKFLNNGANSVSESDVSFDSNGRPEKMHG APCDCGRKCDRQMSFDDYVDYMRQLTTPGDPKPFRESLVLIMFDFKLSLSSSVAYAGQEVLRMLDNYWKRGES GGRAYIVLSIPTIKRITFATGFYDKLHSEGFQYRDKVGVDFSGNEDLDETRILQSSNIVDHIWQSDGITNCLF RVMTRLKKAISKRDSNGYMAKVYTVSVDKYTTMRKALRVAADGMITNFPARLVSVLNESEFSGKFRLATYDDNPW ERYSS</p>
<p>s10C_parcial (ANY30983.1)</p>	<p>MRSFLFLYFVGSIIILIQGVEQDSERADHRRPIWNIAEMVNDRLVDEYLDGANSEIIVAVFDWDGKQPQRMYG FCDCGRNCWRQLGFTEYVDYMRQLTTPGDPKFLLENLVLIMFDLKLNSFPKGVYSIGEDVAVGLLDYTWKRGES GARAYIVLSVPSVERASFITGFYDKLHSEGFQ</p>

<p><b>s11A</b> (ANY30984.1)</p>	<p>MLLSTIISFIGFAVFFQEAYGHVVERADSRKPIWDIAHVMNDLELVDEYLDDGANGLLELDVDFEKDGTAKEMYHG VPCDCFRSCTRSEEFTKYMDYIRQLTTPGNPKFRSOLIMLIMDLKLGIEPNVAYAAGKSVAEKLLSSYWQNGKS GARAYIVLSLETITRPDFIKGFRDAITASGHEELFEKIGWDFSGNEDLGDIRRMYYQYGIEDHIWQGDGITNCIA RGDYRLKEALKKKNDPDYKYTLKVYTHSIDKNSSIRHALRLGVDAIMTNPEDVKSILQESEFSGSHRMATYEDY PWQK</p>
<p><b>s11B</b> (ANY30985.1)</p>	<p>MLLSTVISFIGFAVFFQEAYGHVVERADSRKPIWDIAHVMNDLELVDEYLDDGANGLLELDVDFEKDGTAKEMYHG VPCDCFRSCTRSEEFTKYMDYIRQLTTPGNPKFRSOLIMLIMDLKLGIEPNVAYAAGKSVAEKLLSSYWQNGKS GARAYIVLSLETITRPDFIKGFRDAITASGHEELFEKIGWDFSGNEDLGDIRRMYYQYGIEDHIWQGDGITNCIT RGDYRLKEALKKKNDPDYKYTLKVYTHSIDKNSSIRHALRLGVDAIMTNPEDVKSILQESEFSGSHRMATYEDY PWQK</p>
<p><b>s11C</b> (ANY30986.1)</p>	<p>MWLSAVLSFLELAVVYQVVGHVEERADSRKPIWDIAHVMNDLELVDEYLGDGANGLLELDVAFTKDGTAEKMYHG VPCDCFRSCKRTEEFTKYMDYIRQLTTPGNAKFRSELIMLIMDLKLGIEPNVAYAAGKSVAEKLLSSYWLNGES GARAYIVLSLETITRPDFINGFKDAIYKSGHDELFEKIGWDFSGNEDLGDIRRMYYQYGIEDHIWQGDGITNCIT RGDYRLKEALKKKNDPDYKYTLKVYTHSIDKNSSIRHALRLGVDAIMTNPEDVKSILQESEFSGSHRMATYEDY PWQK</p>
<p><b>s11D</b> (ANY30987.1)</p>	<p>MWLSAVLSFLELAVVYQVVGHVEERADSRKPIWDIAHVMNDLELVDEYLGDGANGLLELDVAFTKDGTAEKMYHG VPCDCFRSCKRTEEFTKYMDYIRQLTTPGNAKFRSELIMLIMDLKLGIEPNVAYAAGKSVAEKLLSSYWLNGES GARAYIVLSLETITRPDFINGFKDAIYKSGHDELFEKIGWDFSGNEDLGDIRRMYYQYGIEDHIWQGDGITNCLP RGDYRLKEAMKKNDPDYKYTLKVYTHSIDKESSIRNALNLGVDAVMTNYPARVKSILQESEFSGTHRMATYDDN PWEK</p>
<p><b>s11E_parcial</b> (ANY30988.1)</p>	<p>TLNFISLYTVVVNGHVEKRADSRKPIWDIAHKVNDLELVDEYLGDGANGLLELDVAFTKDGTAEKMYHGI PCDCFR SCKRTEEFTKYMD</p>
<p><b>s11F_parcial</b> (ANY30989.1)</p>	<p>VLDELGLDVRPPIWNVAHMVNALYQVDYLDMGANSIEFDVAFDRDGIKFTYHGIPDCDCFRSCTKYENFVRYIN YVRQLTTPGNPKFREDLVLLFLDLKVNGLSASAKYTAGA</p>
<p><b>Loxtox s12A</b> (ANY30990.1)</p>	<p>MEGIQRFGIFIVLLVHSSVAKIDYRRPIYVIGVMVNSIGEVKEYLDRGSNVL ESD ISFHTNGNVEKIYHGFPCD CNRTCTGTAKLSTYLDYVREITNYPYSGGYSRKLILQFFDLKLDNVSPGKFKAGQVMADHVLHVLWNLRFNDKL IRVLLYINSISDKDTVVGFIIRRFKERGVEHLLKNVGFDDGLDNLKDIKAMWESIRVKSNNVQGDGVPNCLSHRYP DQRLREELDARDAEAGYIDKVVYHTIDDKTRMRKSLDLEVDGMI TNVPEKLV EILQEQQYANKFRLATVDDDPFQ KFVLHQVQ</p>

## APÊNDICE 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado participante,

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa **"Análise Transcriptômica da Glândula de Veneno de *Loxosceles similis*: Descoberta de Novas Toxinas e Estudo Funcional de Variantes Recombinantes de Loxtox"**, projeto de pesquisa referente à Tese de Débora Priscila Larangote de Oliveira, doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Genética da UFMG, onde é orientada pelo Professor Dr. Evanguedes Kalapothakis. O trabalho é desenvolvido em parceria com o grupo de pesquisa do Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos animais, da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias.

#### 1. Objetivo da pesquisa

Esta pesquisa visa analisar o transcriptoma da glândula de veneno da aranha *L. similis*, popularmente conhecida como aranha-marrom, através da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) visando a elucidação de toxinas com importância para os efeitos fisiopatológicos do loxoscelismo que ainda não foram descritas. A segunda parte do trabalho terá como foco principal expressão e purificação das variantes Loxtox recombinantes denominadas s1A e s11A para estudos de caracterização funcional, incluindo sua função em plaquetas e em quadros de hemólise. Estas proteínas são as principais responsáveis pela ação demonecrótica decorrente do loxoscelismo. As Loxtox do veneno de algumas espécies já foram estudadas quanto a sua capacidade de ativação de plaquetas e agregação pela produção de ácido lisofosfatídico, que estimula os receptores de membrana das plaquetas humanas. Além disso, a atividade hemolítica ocorre em eritrócitos pela ação dessas enzimas, causando hemólise através do metabolismo de fosfolipídeos como esfingomielina e lisofosfatidilcolina.

O convite à sua participação se deve à necessidade de utilizar plaquetas humanas para os ensaios, nos quais serão testados os efeitos das proteínas em estudo na inibição da agregação plaquetária e atividade hemolítica.

#### 2. Do voluntariado e confidencialidade

A sua participação é voluntária, isto é, ela não é obrigatória, e você possui plena autonomia para decidir se deseja ou não participar, bem como interromper sua participação a qualquer momento. Você não será penalizado de nenhuma maneira caso decida não

consentir sua participação, ou desistir da mesma. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa.

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações prestadas por você, sendo que toda a avaliação será realizada de forma individual sem a presença de outros voluntários no local da coleta. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa.

A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar aos pesquisadores informações sobre sua participação e sobre a pesquisa.

### **3. Procedimento**

A sua participação consistirá em fornecer cerca de 20,0 mL de sangue, por meio de uma punção venosa no braço por um profissional habilitado. Os materiais utilizados são estéreis e descartáveis de acordo com as regras de biossegurança. O local para coleta de sangue será no Serviço de Bioquímica de Proteínas equipado com os itens necessários à coleta de sangue e com caixa para perfuro cortante. Você poderá sentir algum pequeno desconforto na hora da coleta do sangue, no local onde a agulha for colocada, que logo desaparecerá, e poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa, que também desaparecerá depois de 2 ou 3 dias. Raramente, os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio.

A coleta de sangue demora cerca de 10 a 15 minutos e poderá ser interrompida a qualquer momento por solicitação do participante. Não existem riscos físicos adicionais a você pela sua participação nesta pesquisa. É importante que você entenda que nenhum procedimento médico será realizado. Apenas será analisada a amostra de sangue que foi coletada no momento da sua participação.

### **4. Armazenamento e descarte do material**

O sangue do participante não será armazenado por mais de 10h desde sua coleta, e após sua utilização será descartado, assim como todo o material utilizado para coleta, conforme Resolução da Diretoria Colegiada, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ANVISA - RDC Nº 306, de 7 de dezembro de 2004. Os dados do experimento serão armazenados em arquivos digitais, assim como os resultados, mas somente os pesquisadores terão acesso a eles.

Ao final da pesquisa, todo material digital será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/12 e orientações do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Fundação Ezequiel Dias.

## **5. Outros**

Você não será remunerado por sua participação e esta pesquisa poderá não oferecer benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso do material do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa.

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, seja possível o aperfeiçoamento do tratamento de doenças trombóticas e assim beneficiar os pacientes acometidos por esse tipo de doença.

## **6. Utilização dos dados da pesquisa:**

Os resultados gerais poderão ser divulgados em palestras, apresentações em congressos e encontros, artigos científicos e na dissertação/tese. Os resultados de forma individual poderão ser repassados aos participantes caso peçam, estando a equipe de pesquisadores à disposição para eventuais esclarecimentos.

## **7. Considerações finais**

Se você concordar com o uso do sangue coletado não terá quaisquer custos ou despesas pela sua participação nessa pesquisa.

Os pesquisadores responsáveis irão proporcionar assistência imediata, bem como responsabilizar-se pela assistência integral aos participantes da pesquisa no que se refere às complicações e danos decorrentes da coleta do sangue venoso dos participantes.

Por favor, sinta-se à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os seus direitos como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, poderás entrar em contato com os pesquisadores.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o CEP/FUNED. O comitê de ética humana tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos

humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

#### 8. Contatos:

e-mail: [cepfuned@funed.mg.gov.br](mailto:cepfuned@funed.mg.gov.br)

Endereço: rua Conde Pereira Cameiro, 80, Bairro Gameleira, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP: 30510-010

Se desejar, consulte ainda a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep):

Tel: (61) 3315-5878 / (61) 3315-5879 e-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br)

*Contato com o pesquisador a responsável:* Débora Oliveira / Evanguedes Kalapothakis

E-mail: [deboralaranote03@gmail.com](mailto:deboralaranote03@gmail.com) / [kalapothakis@gmail.com](mailto:kalapothakis@gmail.com)

Telefone: (31) 9 9523-6100 e (31) 9 9585-3010

#### 9. Questionário (Por favor, responda ao breve questionário abaixo)

- Idade (anos): \_\_\_\_\_.
- Sexo: ( ) Feminino, ( ) Masculino.
- Peso (kg): \_\_\_\_\_.
- Qual é o seu tipo sanguíneo? ( ) A+, ( ) A-, ( ) B+, ( ) B-, ( ) AB+, ( ) AB-, ( ) O+, ( ) O-, ( ) Não sei.
- Você fez uso de algum medicamento nos últimos 10 dias?  
( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_  
( ) NÃO.
- Qual foi o horário da sua última alimentação? \_\_\_\_\_.
- Você possui alguma condição que te leva a ter problemas na coagulação sanguínea? (Exemplos: Hemofilia, deficiência de vitamina K, doenças hepáticas, trombocitopenia, leucemia, outras.)  
( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_  
( ) NÃO.

- Você é portador de alguma doença infectocontagiosa? (Exemplos: Hepatite B ou C, AIDS, Sífilis, Malária, Doença de Chagas, HTLC I ou II, outras.)

( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_

( ) NÃO.

- Você gostaria de fazer alguma observação? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### 10. Declaração final:

Afirmo que todas as informações acima fornecidas por mim são verdadeiras e declaro que li e entendi todo o procedimento, objetivos e condições de minha participação voluntária e não-remunerada na pesquisa; dito isto, concordo em participar por livre e espontânea vontade. Declaro que todo o material utilizado para a coleta do sangue estava devidamente lacrado antes do uso e foi descartado posteriormente. Confirmando que este documento foi elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, por mim (convidado a participar da pesquisa), assim como pelo(a) pesquisador(a) responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ela delegada(s).

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Nome do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

## DOADOR 1

humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

### 8. Contatos:

**e-mail:** [cepfuned@funed.mg.gov.br](mailto:cepfuned@funed.mg.gov.br)

**Endereço:** rua Conde Pereira Carneiro, 80, Bairro Gameleira, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP: 30510-010

Se desejar, consulte ainda a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep):

Tel: (61) 3315-5878 / (61) 3315-5879 e-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br)

**Contato com o pesquisador a responsável:** Débora Oliveira / Evanguedes Kalapothakis

**E-mail:** [deboralarangote03@gmail.com](mailto:deboralarangote03@gmail.com) / [kalapothakis@gmail.com](mailto:kalapothakis@gmail.com)

**Telefone:** (31) 9 9523-6100 e (31) 9 9585-3010

### 9. Questionário (Por favor, responda ao breve questionário abaixo)

- Idade (anos): 31.
- Sexo: (x) Feminino, ( ) Masculino.
- Peso (kg): 55.
- Qual é o seu tipo sanguíneo? (x) A+, ( ) A-, ( ) B+, ( ) B-, ( ) AB+, ( ) AB-, ( ) O+, ( ) O-, ( ) Não sei.
- Você fez uso de algum medicamento nos últimos 10 dias?  
( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_  
(x) NÃO.
- Qual foi o horário da sua última alimentação? 09:00.
- Você possui alguma condição que te leva a ter problemas na coagulação sanguínea? (Exemplos: Hemofilia, deficiência de vitamina K, doenças hepáticas, trombocitopenia, leucemia, outras.)  
( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_  
(x) NÃO.

- Você é portador de alguma doença infectocontagiosa? (Exemplos: Hepatite B ou C, AIDS, Sífilis, Malária, Doença de Chagas, HTLC I ou II, outras.)  
 SIM. Qual? \_\_\_\_\_  
 NÃO.

- Você gostaria de fazer alguma observação? não.  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

#### 10. Declaração final:

Afirmo que todas as informações acima fornecidas por mim são verdadeiras e declaro que li e entendi todo o procedimento, objetivos e condições de minha participação voluntária e não-remunerada na pesquisa; dito isto, concordo em participar por livre e espontânea vontade. Declaro que todo o material utilizado para a coleta do sangue estava devidamente lacrado antes do uso e foi descartado posteriormente. Confirmo que este documento foi elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, por mim (convitado a participar da pesquisa), assim como pelo(a) pesquisador(a) responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ela delegada(s).

Belo Horizonte, 11 de Junho de 2025

Debora Priscila L. de Oliveira

**Nome do Participante**



**Assinatura do Participante**

Debora Priscila L. de Oliveira

**Nome do Pesquisador**



**Assinatura do Pesquisador**

## DOADOR 2

humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

### 8. Contatos:

**e-mail:** [cepfuned@funed.mg.gov.br](mailto:cepfuned@funed.mg.gov.br)

Endereço: rua Conde Pereira Carneiro, 80, Bairro Gameleira, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP: 30510-010

Se desejar, consulte ainda a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep):

Tel: (61) 3315-5878 / (61) 3315-5879 e-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br)

**Contato com o pesquisador a responsável:** Débora Oliveira / Evanguedes Kalapothakis

**E-mail:** [deboralarangote03@gmail.com](mailto:deboralarangote03@gmail.com) / [kalapothakis@gmail.com](mailto:kalapothakis@gmail.com)

**Telefone:** (31) 9 9523-6100 e (31) 9 9585-3010

### 9. Questionário (Por favor, responda ao breve questionário abaixo)

- Idade (anos): 34.
- Sexo: ( ) Feminino, () Masculino.
- Peso (kg): 90.
- Qual é o seu tipo sanguíneo? ( ) A+, ( ) A-, ( ) B+, ( ) B-, () AB+, ( ) AB-, ( ) O+, ( ) O-, ( ) Não sei.
- Você fez uso de algum medicamento nos últimos 10 dias?  
( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_  
() NÃO.
- Qual foi o horário da sua última alimentação? 9h.
- Você possui alguma condição que te leva a ter problemas na coagulação sanguínea? (Exemplos: Hemofilia, deficiência de vitamina K, doenças hepáticas, trombocitopenia, leucemia, outras.)  
( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_  
() NÃO.

- Você é portador de alguma doença infectocontagiosa? (Exemplos: Hepatite B ou C, AIDS, Sífilis, Malária, Doença de Chagas, HTLC I ou II, outras.)

( ) SIM. Qual? \_\_\_\_\_.

(x) NÃO.

- Você gostaria de fazer alguma observação? Não \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

#### 10. Declaração final:

Afirmo que todas as informações acima fornecidas por mim são verdadeiras e declaro que li e entendi todo o procedimento, objetivos e condições de minha participação voluntária e não-remunerada na pesquisa; dito isto, concordo em participar por livre e espontânea vontade. Declaro que todo o material utilizado para a coleta do sangue estava devidamente lacrado antes do uso e foi descartado posteriormente. Confirmando que este documento foi elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, por mim (convitado a participar da pesquisa), assim como pelo(a) pesquisador(a) responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ela delegada(s).

Belo Horizonte, 11 de junho de 25.

Guilherme Oliveira Santos  
 Nome do Participante

Guilherme Oliveira Santos  
 Assinatura do Participante

Débora Triscala L. de Oliveira  
 Nome do Pesquisador

[Assinatura]  
 Assinatura do Pesquisador

## APÊNDICE 2 - Artigo publicado

SAÚDE

### MOLECULAR EVIDENCE OF PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) IN THE VENOM OF *Loxosceles similis*

#### *EVIDÊNCIA MOLECULAR DE FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) NO VENENO DE *Loxosceles similis**

Débora Larangote, Yan Kalapothakis, Kelton Miranda, Evanguedes Kalapothakis

Universidade Federal de Minas Gerais. kalapothakis@gmail.com

#### ABSTRACT

Brown spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) occur in temperate and tropical regions. Their bites can cause loxoscelism, a condition classified by the WHO as a neglected public health problem. In Brazil, where species of medical importance are concentrated in the South and Southeast regions, cases have been increasing. Although *Loxosceles similis* is associated with underground environments, it also occurs in surface areas and even in homes, suggesting potential endemicity. Caves, especially tourist caves, can harbor the species, posing a risk of accidents. The bite is usually painless at first, and pain arises after 2 to 4 hours, which often delays treatment. In this study, with the aim of locating the main components of *L. similis* venom, we analyzed the transcriptome of the venom gland and identified a Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) coding sequence, the first record of this type in *Loxosceles*. The presence of this sequence indicates that the venom may contain additional enzymes besides Loxtox family, potentially involved in tissue damage, inflammation, and systemic manifestations. These results expand our knowledge about the composition of the venom and the molecular mechanisms of loxoscelism.

**KEYWORDS:** *Loxosceles similis*, Brown Spider, Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>, LsPLA<sub>2</sub>-1.

#### RESUMO

As aranhas marrons do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) ocorrem em regiões temperadas e tropicais. Suas picadas podem causar o loxoscelismo, uma condição classificada pela OMS como problema de saúde pública negligenciado. No Brasil, onde as espécies de importância médica se concentram nas regiões Sul e Sudeste, os casos têm aumentado. Embora *Loxosceles similis* seja associada a ambientes subterrâneos, também ocorre em áreas de superfície e até em residências, sugerindo potencial endemicidade. Cavernas, especialmente as turísticas, podem abrigar a espécie, representando risco de acidentes. A picada é geralmente indolor no início, e a dor surge após 2 a 4 horas, o que frequentemente atrasa o tratamento. Neste estudo, com o objetivo de localizar os principais componentes do veneno de *L. similis*, analisamos o transcriptoma da glândula de veneno e identificamos uma sequência codificadora de Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), sendo o primeiro registro desse tipo em *Loxosceles*. A presença dessa sequência indica que o veneno pode conter

## MOLECULAR EVIDENCE OF PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) IN THE VENOM OF *Loxosceles similis*

### *EVIDÊNCIA MOLECULAR DE FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) NO VENENO DE *Loxosceles similis**

Débora Larangote, Yan Kalapothakis, Kelton Miranda, Evanguedes Kalapothakis

Universidade Federal de Minas Gerais. kalapothakis@gmail.com

#### ABSTRACT

Brown spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) occur in temperate and tropical regions. Their bites can cause loxoscelism, a condition classified by the WHO as a neglected public health problem. In Brazil, where species of medical importance are concentrated in the South and Southeast regions, cases have been increasing. Although *Loxosceles similis* is associated with underground environments, it also occurs in surface areas and even in homes, suggesting potential endemicity. Caves, especially tourist caves, can harbor the species, posing a risk of accidents. The bite is usually painless at first, and pain arises after 2 to 4 hours, which often delays treatment. In this study, with the aim of locating the main components of *L. similis* venom, we analyzed the transcriptome of the venom gland and identified a Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) coding sequence, the first record of this type in *Loxosceles*. The presence of this sequence indicates that the venom may contain additional enzymes besides Loxtox family, potentially involved in tissue damage, inflammation, and systemic manifestations. These results expand our knowledge about the composition of the venom and the molecular mechanisms of loxoscelism.

**KEYWORDS:** *Loxosceles similis*, Brown Spider, Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>, LsPLA<sub>2</sub>-1.

#### RESUMO

As aranhas marrons do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) ocorrem em regiões temperadas e tropicais. Suas picadas podem causar o loxoscelismo, uma condição classificada pela OMS como problema de saúde pública negligenciado. No Brasil, onde as espécies de importância médica se concentram nas regiões Sul e Sudeste, os casos têm aumentado. Embora *Loxosceles similis* seja associada a ambientes subterrâneos, também ocorre em áreas de superfície e até em residências, sugerindo potencial endemicidade. Cavernas, especialmente as turísticas, podem abrigar a espécie, representando risco de acidentes. A picada é geralmente indolor no início, e a dor surge após 2 a 4 horas, o que frequentemente atrasa o tratamento. Neste estudo, com o objetivo de localizar os principais componentes do veneno de *L. similis*, analisamos o transcriptoma da glândula de veneno e identificamos uma sequência codificadora de Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), sendo o primeiro registro desse tipo em *Loxosceles*. A presença dessa sequência indica que o veneno pode conter

enzimas adicionais além das Loxtox, potencialmente envolvidas em danos teciduais, inflamação e manifestações sistêmicas. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre a composição do veneno e os mecanismos moleculares do loxoscelismo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Loxosceles similis*, Aranha marrom, Fosfolipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>, LsPLA<sub>2</sub>.

## INTRODUCTION

Spiders of the genus *Loxosceles*, popularly known as brown spiders, belong to the family Sicariidae and form a group comprise approximately 148 accepted species<sup>1</sup> found in regions with tropical and temperate climates in the America, Oceania, Asia, Africa and Europe. *Loxosceles* spiders are considered one of the most dangerous groups of spiders worldwide<sup>2</sup>, and accidents involving this genus are considered a public health problem in South America, including Brazil, with the South and Southeast regions considered endemic for loxoscelism<sup>3</sup>.

In Brazil, the number of accidents involving spiders of the genus *Loxosceles* has increased over the years, despite being underestimated because of flaws in the notification system<sup>4</sup>, owing to a lack of information and awareness among the population and health professionals. In 2024, 9,657 accidents involving spiders of this genus were reported, and the fatality rate, calculated as the ratio of deaths to notifications, increased from 0.08% in 2014 to 0.39% in 2024<sup>5</sup>. Loxoscelism is a clinical condition resulting from poisoning by spiders of the genus *Loxosceles*. It can lead to serious clinical symptoms, mainly due to dermonecrotic lesions arising from the disruption of connective tissue by venom components that affect homeostasis, as has already been demonstrated for *Loxosceles similis*<sup>6,7</sup> and other *Loxosceles* species<sup>8-10</sup>.

Systemic loxoscelism is characterized by intravascular hemolysis, platelet aggregation, and acute kidney injury<sup>11</sup>. Clinical manifestations such as oliguria and dark urine indicate extensive hemolysis and often precede acute renal failure, which is the main cause of loxoscelism-related mortality<sup>4</sup>. Kidney injury arises from the rupture of red blood cells induced by toxins from the Loxtox family, releasing

hemoglobin that is filtered by the renal glomeruli and precipitates within the tubules, leading to obstruction of urinary flow<sup>12-14</sup>.

*L. similis* is one of the 21 species of *Loxosceles* that occur in Brazil<sup>1</sup>, commonly found inhabiting caves, including tourist-accessible sites such as the 'Gruta da Lapinha' in Minas Gerais State. In 2001, Andrade *et al.* warned about the risk of loxoscelism in tourist caves in Mato Grosso do Sul, owing to the presence of *L. similis*<sup>15</sup>. In human dwellings, a study published by our group in 2005, documented the presence of *L. similis* inside residences in Belo Horizonte<sup>16</sup>, located in the southeastern region of Brazil. The variety of habitats in which these species live, contributes to this expansion and makes them potentially synanthropic, increasing the risk of loxoscelism.

*Loxosceles* spider venom contains bioactive components such as Loxtox, metalloproteinases, hyaluronidases, and insecticidal toxins<sup>17</sup>. The presence and significant role of secreted phospholipase 2 (sPLA2) in other arthropod venoms, such as those of scorpions and honeybees<sup>18,19</sup>, underscores the potential biological importance of characterizing these enzymes in spider venoms. The venom of *L. similis* has hemolytic activity, causing the direct lysis of human erythrocytes in a concentration-dependent manner<sup>20</sup>. Although enzymes from the Loxtox family are recognized as the primary toxins responsible for hemolysis in *Loxosceles* venom, the role of sPLA2 remains unclear. Given the established importance of sPLA2 in the venom of bees and scorpions, where it contributes to membrane disruption and hemolysis, it is plausible that sPLA2 participate in the hemolytic mechanisms of *L. similis* venom, either independently or synergistically with Loxtox, warranting further investigation.

Secreted isoform hvPLA<sub>2</sub> is abundant in honeybee venom (hv) and contributes to membrane disruption, inflammatory responses, and allergenic effects<sup>19,21</sup>. Similarly, scorpion sPLA<sub>2</sub>, often exhibit unique structural adaptations, as observed in Phaiodactylipin (*Amuroctonus phaiodactylus*)<sup>22</sup>, HmTx (*Heterometrus laoticus*)<sup>23</sup> and Sm-PLGV (*Scorpio maurus*)<sup>24</sup>. PLA<sub>2</sub> displays diverse biological activities, including potent hemolytic effects on mammalian

erythrocytes, membrane disruption through phospholipid hydrolysis, induction of muscular inflammation, anticoagulant properties, high toxicity toward arthropods, and modulation of muscle excitation and calcium signaling via the inhibition of ryanodine binding to skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  channels<sup>25</sup>. The ryanodine receptor (RyR) plays a crucial role in neurons and, is being essential for calcium-dependent signaling, synaptic plasticity, and neuronal development. Toxins that inhibit ryanodine binding to RyRs can modulate muscle and neural excitation, impair signal transmission, and elicit neurotoxic effects. These enzymes are crucial for the effectiveness and potency of the venom in these species.

The large subunit structure of HmTx is highly similar to *Pandinus imperator* Imperatoxin I (IpTx(i)) and to *Mesobuthus tamulus* PLA<sub>2</sub> (MtPLA<sub>2</sub>). The three-dimensional structure of HmTx consists of three conserved alpha-helices: h1 (Lys24-His34), h2 (Cys59-Asp71), and h3 (Ala80-Phe89). The beta-sheet consisted of a single-stranded anti-parallel beta-sheet (b1.1 at Glu43-Lys45 and b1.2 at Lys48-Asn50) that was highly similar to the conserved sequences (-CGXG-, -CCXXHDXC- and -CXCEXXXXXC-) of *Apis mellifera* (bee) phospholipases.

Partial characterization of the venom from *Phoneutria boliviensis* was conducted, with emphasis on the detection of PLA<sub>2</sub> activity, which has not previously been described for this genus. The presence of PLA<sub>2</sub> was confirmed through specific enzymatic assays, in which the venom and two fractions obtained using Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) demonstrated the ability to hydrolyze the substrate 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid, indicating significant PLA<sub>2</sub> activity. This finding was further supported by the pronounced calcium-dependent indirect hemolysis observed in laboratory tests, a classic indicator of PLA<sub>2</sub> presence in animal venom<sup>26</sup>. In this context, the role of PLA<sub>2</sub> in envenomation was confirmed by the indirect hemolytic activity of the venom, specific hydrolysis of the synthetic PLA<sub>2</sub> substrate, and identification of active fractions using RP-HPLC.

In this study, we explored the transcriptome of the *L. similis* venom gland and identified a sequence that potentially encodes PLA<sub>2</sub>. To the best of our

knowledge, this is the first report of a PLA<sub>2</sub> transcript from the *Loxosceles* genus. This discovery indicates that the venom of *L. similis* may contain enzymatic components beyond the well-known Loxtox family<sup>7,27</sup>, which could play a significant role in exacerbating local tissue injury, driving inflammatory responses, and contributing to the systemic symptoms associated with loxoscelism. These insights enrich the current understanding of the molecular diversity in *Loxosceles* venom glands and open new possibilities for elucidating the complex processes underlying envenomation, ultimately guiding the development of improved therapeutic strategies.

## METHODOLOGY

### NGS SEQUENCING AND BIOINFORMATIC ANALYSIS

*L. similis* specimens were collected from the touristic cave “Gruta da Lapinha”, located in the Sumidouro State Park, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil (43°57'W, 19°33'S), as previously described<sup>27</sup>. The collection was performed under a license from the “Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais” (IEF/MG; license number 047.2012). Spiders were identified using a previously described method<sup>28</sup>.

The venom glands of 35 spiders were removed as described previously<sup>29</sup>. Total RNA was extracted from a pool of venom glands using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA), following the manufacturer’s instructions. After RNA purification, quantification was performed using a Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, MD, USA), and the RNA was stored at -80°C until cDNA library construction. The quality and integrity of the obtained RNA were evaluated using agarose gel electrophoresis (1%).

Next Generation Sequencing (NGS) was performed using an automated MiSeq sequencer (NextSeq 550 System - Illumina®). The cDNA library was prepared with 1 µg total RNA, using the TruSeq™ RNA Sample Set Kit, Version2 (KR045) and TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit, Version 2, according to the

manufacturer's instructions (Illumina®, CA, USA). The KAPA library quantification kit (Illumina®) was used to quantify cDNA libraries. Sequencing was performed using an automated MiSeq sequencer with MiSeq Reagent Kit (v.3; 300 cycles) using a paired-end strategy.

Trimming, filtration and *de novo* assembly methodology were performed using the Geneious Prime 2022.1.1 software, as described<sup>30</sup>.

Raw reads were trimmed and filtered with the quality parameter Phred  $\geq 30$ , generating a file that was used to assemble the contigs, and Illumina® adapters were removed. After trimming and filtering, 14.3 million reads were retained. *De novo* assembly was then performed using a k-mer value of 24 and a bubble size of 150, resulting in 685,366 contigs.

Annotations were performed to identify PLA<sub>2</sub>. We search in the PHTK software using known protein patterns found in the consensus sequence of known PLA<sub>2</sub> from the database<sup>31</sup>.

To accelerate and improve the identification of novel protein sequences, specific sequence motifs were searched against contigs generated via *de novo* assembly. For this purpose, our group developed the PHTK program<sup>32</sup>, a tool designed to detect predefined patterns within nucleotide or amino acid sequences. PHTK program, provides a folder of query reads or contigs and a motif or sequence of interest, that scans the input to identify regions that match the specified pattern. For example, in searches aimed at identifying conserved cysteine arrangements that characterize specific toxin families, sequence motifs such as C20CC5C can be used. This notation specifies the spacing of cysteine residues, where the numbers represent the exact number of amino acid residues separating consecutive cysteines. Using these motifs, sequences that share distinctive structural features can be efficiently retrieved and compared.

This strategy aimed to identify the conserved cysteine pattern observed in the sequence alignment of PLA<sub>2</sub> from scorpions and bees (C20CC5C23C1C6C23C10C)<sup>19,25</sup>, as well as the consensus sequence of the

catalytic sites characteristic of Group IA PLA<sub>2</sub>s (Y28G30G32)<sup>33</sup>, Group IVA (R57K58R59)<sup>34</sup> and Group VIA (G-X-S519-X-G)<sup>35</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

For the first time in the literature, a sequence showing similarity to the PLA<sub>2</sub> group of enzymes was found among the transcripts of *L. similis* and subsequently designated as LsPLA<sub>2</sub>-1 (Figure 1), where “Ls” refers to *Loxosceles similis*, “PLA<sub>2</sub>” denotes phospholipase A<sub>2</sub>, and the suffix “-1” indicates that this is the first sequence of this enzyme family identified in this species. LsPLA<sub>2</sub>-1 is a high-molecular-weight protein with putative enzymatic activity that degrades the extracellular matrix. Table 1 presents the identified sequence, highlighting the signal peptide and cysteine residues in the catalytic site<sup>25</sup> as well as its affiliation with the primary sequence and mature protein. Sequences similar to PLA<sub>2</sub> have been reported in transcriptomic analyses of other spider species, such as *Pamphobeteus verdolaga*<sup>36</sup> and *Phoneutria boliviensis*<sup>26</sup>.

Analysis using EXPASY ProtParam indicated that the full-length primary sequence of LsPLA<sub>2</sub>-1 encodes a protein of 319 amino acids, with a predicted molecular weight of approximately 38 kDa and a theoretical pI of 7.4. Following signal peptide cleavage and post-translational processing, the mature form consists of 295 amino acids with an estimated molecular weight of 33 kDa and a theoretical pI of 7.94.

PLA<sub>2</sub>, also known as phosphatidylcholine-2-acyl hydrolase, is a widespread superfamily of enzymes found in various organisms, including vertebrates and invertebrates<sup>19,37</sup>. This superfamily is classified into 15 distinct groups, organized into five main types: sPLA<sub>2</sub>, cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), calcium-independent PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>), platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) and lysosomal PLA<sub>2</sub><sup>38</sup>. Despite their diversity, these proteins exhibit remarkably conserved structural and functional properties.

Figure 1. Phospholipase-A<sub>2</sub> toxin from *L. similis* venom gland.

1	atg	gtg	gtg	cgc	gat	tat	acc	att	gtg	tgc	tgg	gtg	ctg	ctg	ctg	ttt	ctg	ctg	ttt	aac
	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>C</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>N</b>
21	gtg	agc	gat	ggc	aaa	aaa	cgc	gat	aaa	gtg	ttt	att	ctg	cag	aaa	gaa	aac	ccg	gat	cat
	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	K	R	D	K	V	F	I	L	Q	K	E	N	P	D	H
41	ccg	aaa	ccg	aaa	ctg	ctg	gtg	acc	tgg	agc	agc	gaa	aaa	gaa	ggc	gat	ttt	ggc	ggc	
	P	K	P	K	L	L	V	V	T	W	S	S	E	K	E	G	D	F	G	G
61	tgc	gaa	ttt	ttt	gat	gat	cag	aac	ctg	att	gat	gaa	gtg	ctg	agc	agc	gcg	agc	gat	agc
	<b>C</b>	E	F	F	D	D	Q	N	L	I	D	E	V	L	S	S	A	S	D	S
81	gaa	att	cag	acc	acc	agc	gaa	gaa	gaa	atg	gaa	gat	ctg	ctg	gaa	gat	tgc	acc	cag	gtg
	E	I	Q	T	T	S	E	E	E	M	E	D	L	L	E	D	<b>C</b>	T	Q	V
101	agc	ctg	cgc	aaa	aaa	cgc	cag	gtg	tat	ttt	cag	tat	ccg	ggc	gtg	ccg	aac	ttt	aac	gat
	S	L	R	K	K	R	Q	V	Y	F	Q	Y	P	G	V	P	N	F	N	D
121	cgc	gcg	cag	agc	acc	aac	ctg	cgc	cgc	ggc	aaa	cag	cgc	ggc	aaa	cag	cgc	gaa	agc	acc
	R	A	Q	S	T	N	L	R	R	S	G	K	Q	R	R	S	E	S	T	
141	acc	aaa	agc	acc	acc	gaa	agc	aac	ctg	gaa	atg	gaa	ggc	ccg	aaa	cag	gaa	gcg	gcg	acc
	T	K	S	T	T	E	S	N	L	E	M	E	G	P	K	Q	E	A	A	T
161	gaa	ggc	tat	gat	ggc	tgg	aac	ctg	att	ttt	ccg	ggc	acc	aaa	tgg	tgc	ggc	gcg	ggc	gat
	E	G	Y	D	G	W	N	V	I	F	P	G	T	K	W	<b>C</b>	G	A	G	D
181	att	gcg	aaa	aac	tat	gat	gat	ctg	ggc	ctg	cat	gaa	gat	acc	gat	aaa	tgc	tgc	cgc	gcg
	I	A	K	N	Y	D	D	L	G	L	H	E	D	T	D	K	<b>C</b>	<b>C</b>	R	A
201	cat	gat	tgc	tgc	aac	gat	acc	ctg	gcg	ccg	ggc	gcg	acc	cgc	aac	aac	ctg	acc	aac	aac
	H	D	L	<b>C</b>	N	D	T	L	A	P	G	A	T	R	N	N	L	T	N	N
221	agc	ccg	ttt	acc	aaa	ctg	agc	tgc	aaa	tgc	gat	cag	gat	ttt	tat	aac	tgc	ctg	gat	cgc
	S	P	F	T	K	L	S	<b>C</b>	K	<b>C</b>	D	Q	D	F	Y	N	<b>C</b>	L	D	R
241	gtg	aac	agc	att	att	agc	aac	aaa	att	ggc	aac	gtg	tat	ttt	aac	gtg	ctg	cgc	cgc	gat
	V	N	S	I	I	S	N	K	I	G	N	V	Y	F	N	V	L	R	R	D
261	tgc	tat	gaa	ctg	gat	tat	ccg	ctg	acc	aaa	aaa	tgc	aaa	acc	ttt	cgc	agc	ctg	ctg	aaa
	<b>C</b>	Y	E	L	D	Y	P	L	T	K	K	<b>C</b>	K	T	F	R	S	L	L	K
281	att	acc	tgc	aaa	gaa	tat	gcg	cgc	aac	acc	aaa	gcg	ccg	aaa	gtg	tat	cag	tgg	aaa	agc
	I	T	<b>C</b>	K	E	Y	A	R	N	T	K	A	P	K	V	Y	Q	W	K	S
301	gcg	aaa	gtg	tat	aaa	aaa	ctg	ccg	ttt	ccg	ggc	ccg	att	acc	gtg	acc	ctg	ccg	ttt	
	A	K	V	Y	K	K	L	P	F	P	G	P	I	T	V	T	L	P	F	

The nucleotide and deduced amino acid sequences of LsPLA<sub>2</sub>-1 (GenBank PX396025) are shown. In the protein sequence, the predicted signal peptide using Signal IP 5.0 is highlighted in gray. Lysin (K) in cyan indicates the first amino acid of the mature protein with 295 amino acids.

Table 1. Sequence similarity of LsPLA<sub>2</sub>-1 to homologous proteins identified using BLASTP.

PHOSPHOLIPASE A <sub>2</sub>						
Toxin	Amino acid sequence	Affiliation	E-value	Similarity	ID	QC
LsPLA <sub>2</sub> -1	<u>MVVRDYTIVCWVLLLFLLFNVS</u> <b>DG</b> <u>KKRDKV</u> FLLQKENPDHFKPKLLVVTWSSEKEGDFGG <b>C</b> EFFDDQNLIDEVLSSASDSEIQTTSSEEM EDLLED <b>C</b> TQVSLRKKRQVYFQYPGVPNFND RAQSTNLRRRSGKQRRSESTTKSTTESNLE MEGPKQEAATEGYDGWNVIFPGTK <b>C</b> GAGD IAKNYDDLGLHEDT <b>DKC</b> RAH <b>DLC</b> NDTLAP GATRNNTNNSPFTKLS <b>C</b> K <b>C</b> DQDFY <b>C</b> GLDR VNSTIISNKIGNVYFNVLR <b>RDC</b> YELDYPLTK R <b>C</b> K <b>T</b> FRSLLK <b>ITC</b> KEYARNTKAPKVYQ <b>W</b> KS AKVYK <b>L</b> FFPGPITVTL <b>PF</b>	(P) Phospholipase A <sub>2</sub> -like (KFM82483.1) <i>Stegodyphus</i> <i>mimosarum</i>	9e <sup>-117</sup>	64%	49.72%	99%
	(M) Phospholipase A <sub>2</sub> -like (KFM82483.1) <i>Stegodyphus</i> <i>mimosarum</i>	1e <sup>-113</sup>	66%	52.66%	99%	

The signal peptide, predicted using SIGNALP 5.0, is indicated by underlining, with the first amino acid of the mature protein in cyan. Twelve cysteine residues are highlighted in yellow, with 10 located within the catalytic domain and emphasized in bold. The catalytic site, according to InterPro, is highlighted in gray. The sequence identity (ID) and query coverage (QC) with reference proteins are presented in the last two columns. P indicates the primary sequence, and M indicates the mature protein.

Animal venom is a rich source of structurally diverse secreted sPLA<sub>2</sub>, which is subdivided into 16 subgroups: IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB, XIII, XIV, and XV. The most extensively studied venom sPLA<sub>2</sub> is derived from Elapidae snakes (group IA), Viperidae snakes (groups IIA and IIB), and bees (group III), each characterized by unique structural motifs and disulfide bond arrangements that underpin their diverse toxicological and pharmacological functions. Group IA enzymes contain a conserved calcium-binding loop featuring a critical tyrosine residue (Y28), an elapid-specific loop insertion between the second  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -strands, and a catalytic network centered around histidine, aspartic acid, and tyrosine residues. Group IIA and IIB enzymes share a calcium-binding motif and catalytic residues, but diverge in their disulfide bond patterns, with the absence of the Cys61–Cys91 bond in group IIB. Group III enzymes, exemplified by bee venom PLA<sub>2</sub>, display a distinct calcium-binding loop in which tryptophan replaces the conserved tyrosine, shorter  $\alpha$ -helices, and increased  $\beta$ -sheet content. Additionally, PLA<sub>2</sub>-like proteins, although catalytically inactive, possess unique membrane interaction motifs including cationic residues that form membrane docking sites and hydrophobic residues that constitute membrane disruption sites, which are integral to their cytotoxic activities. Although other PLA<sub>2</sub> types, such as cPLA<sub>2</sub> and iPLA<sub>2</sub>, are present in venom glands, their roles in venom pathophysiology are less well defined than those of sPLA<sub>2</sub>. This structural and functional diversity among the sPLA<sub>2</sub> subgroups equips animal venoms with a broad array of biological activities and mechanisms of action<sup>39</sup>.

LsPLA<sub>2</sub>-1 is a full-length sequence that retain cysteine residues essential for the formation of characteristic disulfide bridges<sup>19,31</sup>. The primary sequence and mature protein exhibited 64% and 65% similarity, respectively, to PLA<sub>2</sub> from the spider *Stegodyphus mimosarum* (UniProt A0A087U096) (Table 1), which belongs to Group XV of PLA<sub>2</sub>, a lysosomal, calcium-independent enzyme that degrades glycerophospholipids and transfers acyl groups to ceramides. This class of phospholipase A<sub>2</sub> is well characterized in mammals, where it plays a central role in lysosomal phospholipid degradation, functioning optimally at an acidic pH and

independently of calcium ions. In spider venom, sPLA<sub>2</sub> is expected to facilitate the disruption of prey cell membranes and promote tissue digestion, thereby contributing to cytotoxicity, rapid prey immobilization, and synergistic interactions with other venom components that amplify the overall toxic effects. In a study by Estrada-Gómez *et al.*, one of the contigs obtained from the transcriptome analysis of the spider *P. verdolaga* exhibited approximately 80% sequence similarity to *S. mimosarum* PLA<sub>2</sub> and showed similarity to PLA<sub>2</sub> sequences from other taxa, such as insects, lizards, and ticks<sup>40</sup>.

Although relatively few studies have focused on spider venom PLA<sub>2</sub> enzymes, several sequences have been identified and deposited in the public databases. Refinement of the BLASTP parameters for the alignment of LsPLA<sub>2</sub>-1 with the spider isoforms, revealed significant sequence similarities (Table 2). According to UniProt, most of these sequences correspond to cPLA<sub>2</sub>, with the exception of XP\_054716960.1 from *Uloborus diversus*, which is annotated as a putative sPLA<sub>2</sub>. In UniProt, the biological activity of proteins is classified based on curated annotations derived from experimental evidence, literature and computational predictions. This information is integrated into functional descriptions, including molecular functions, biological processes, and pathway involvement, providing a standardized framework for protein characterization. The alignment results are shown in Figure 2, highlighting the key catalytic motifs IFPGTKWCG (residues 145–153), DLGXXXDTDxCCRAHDXC (residues 163–180), and LTNXSPFTXLSCDXDFYXC (residues 193–213). A conserved set of 12 cysteine residues was identified, with 10 localized within the catalytic domain, as indicated in bold in Figure 2: C153C173C174C180C204C206C213C237C248C259. The numbering of amino acid residues corresponds to that of the LsPLA<sub>2</sub>-1 mature protein.

Although current knowledge of PLA<sub>2</sub> in spiders is still scarce, more comprehensive insights are available for scorpions and the LsPLA<sub>2</sub>-1 sequence can display substantial similarity to PLA<sub>2</sub> isoforms identified in scorpion venoms, suggesting possible structural or functional conservation across distant arachnid

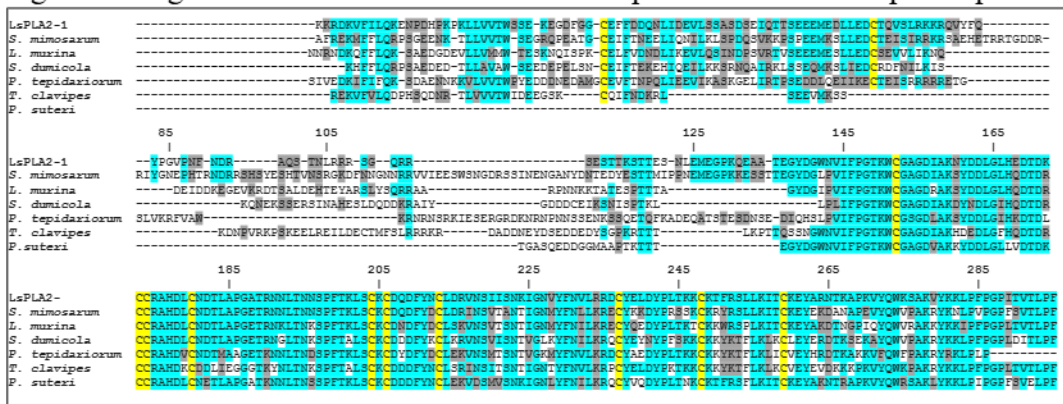
lineages. In the context of the scorpion clade, a previous study by our group, provided the first evidence of functional PLA<sub>2</sub> activity in *Tityus melici* venom, as confirmed using an indirect hemolytic assay. Transcriptomic analysis identified an sPLA<sub>2</sub> gene with 98% sequence similarity to its homolog in *Tityus serrulatus*<sup>30,41</sup>. Figure 3 shows the alignment of LsPLA<sub>2</sub>-1 with PLA<sub>2</sub> sequences from *T. serrulatus* and *T. melici*. Although sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity has not yet been demonstrated in *Loxosceles* venom, their proposed contribution to loxoscelism underscores the importance of further investigation into their potential functional role in spider venoms.

Table 2. Alignment parameters of LsPLA<sub>2</sub>-1 against PLA<sub>2</sub> sequences from other spider species, obtained using BLASTP analysis.

Organism	Accession Number	Total Score	QC	E-value	ID	Acc Length
<i>Periegops suteri</i>	QHA25180.1	295	56%	2e-100	75.42%	18
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	KFM182482.1	181	55%	5e-32	73.33%	370
<i>Caerostris dawrini</i>	GIY79658.1	178	45%	4e-52	55.63%	34
<i>Uloborus diversus</i> ***	XP_054716960.1	278	86%	4e-92	51.46%	272
<i>Trichonephila inaurata madagascariensis</i>	GFY62303.1	268	92%	2e-87	51.02%	335
<i>Argiope bruennichi</i>	KAF8783068.1	158	48%	1e-45	50.65%	255
<i>Trichonephila clavipes</i>	GFX25397.1	282	92%	2e-92	50.51%	378
<i>Nephila pilipes</i>	GFS29729.1	278	92%	2e-91	50.34%	315
<i>Trichonephila clavata</i>	GFR30777.1	270	92%	1e-87	50.17%	388
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	KFM182483.1	345	99%	4e-117	49.72%	360
<i>Trichonephila clavipes</i>	GFX25412.1	179	53%	1e-53	49.41%	238
<i>Argiope bruennichi</i>	KAF8783069.1	152	46%	1e-41	49.01%	429
<i>Nephila pilipes</i>	GFS75130.1	181	54%	3e-54	48.26%	283
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	KFM182478.1	279	92%	5e-92	47.95%	314
<i>Nephila pilipes</i>	GF165360.1	122	34%	4e-32	47.71%	212
<i>Araneus ventricosus</i>	GBM190199.1	277	98%	2e-91	46.82%	284
<i>Caerostris extrusa</i>	GIY90557.1	228	86%	1e-71	45.82%	336
<i>Araneus ventricosus</i>	GBN62881.1	132	43%	4e-35	45.26%	302
<i>Caerostris extrusa</i>	GIY41771.1	148	54%	2e-42	44.83%	191
<i>Nephila pilipes</i>	GFS39049.1	159	59%	3e-47	44.68%	157
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	KFM172530.1	104	32%	6e-25	44.66%	273
<i>Argiope bruennichi</i>	XP_055939774.1	137	41%	2e-37	44.62%	249
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	XP_015925461.2	141	43%	2e-38	44.20%	307
<i>Trichonephila clavipes</i>	GFX25390.1	141	43%	1e-38	43.80%	283
<i>Caerostris dawrini</i>	GIY23761.1	201	85%	1e-62	43.38%	232
<i>Stegodyphus dumicola</i>	XP_035226339.1	91.7	30%	2e-21	42.71%	132
<i>Argiope bruennichi</i>	XP_055933415.1	135	43%	8e-37	42.65%	256
<i>Araneus ventricosus</i>	GBL82754.1	136	43%	2e-36	42.65%	312
<i>Trichonephila inaurata madagascariensis</i>	GFY71282.1	134	43%	3e-36	42.65%	250
<i>Nephila pilipes</i>	GFS57439.1	130	43%	5e-35	42.65%	251
<i>Stegodyphus dumicola</i>	XP_035213673.1	135	41%	1e-36	42.42%	264
<i>Argiope bruennichi</i>	KAF8783066.1	136	43%	8e-37	42.03%	292
<i>Stegodyphus dumicola</i>	XP_035205653.1	133	43%	3e-36	42.03%	229
<i>Trichonephila clavata</i>	GFR30780.1	131	43%	8e-35	42.03%	280
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	XP_015911956.1	130	43%	8e-35	41.91%	251
<i>Caerostris extrusa</i>	GIY36382.1	129	43%	9e-35	41.91%	212
<i>Stegodyphus mimosarum</i>	KFM182479.1	221	87%	2e-69	41.43%	288
<i>Araneus ventricosus</i>	GBN03458.1	162	69%	3e-47	41.18%	243

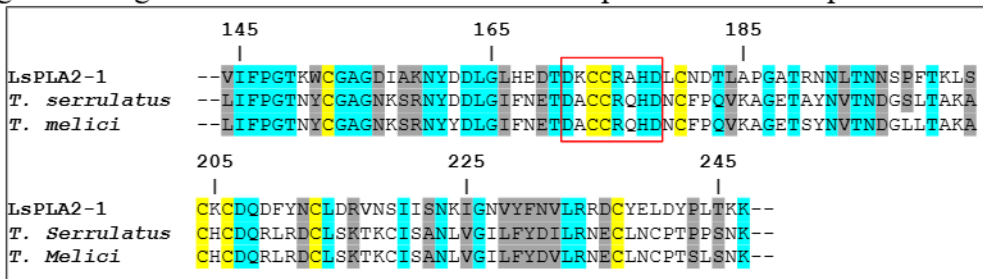
Presents metrics including sequence identity (ID), query coverage (QC), and E-values, highlighting the degree of conservation and divergence among spider PLA<sub>2</sub>s as revealed by comparative alignment. Nine sequences with identity ≤40% were identified but not included in Table 2. \*\*\* indicates a sPLA<sub>2</sub>. Acc Length indicates the total length of the sequence deposited in the database.

Figure 2. Alignment of LsPLA2-1 with PLA2 sequences from other spider species.



Conserved cysteine residues are highlighted in yellow, identical residues are shown in cyan blue and conserved residues are indicated in light gray. The alignment was performed using the mature protein sequences, revealing patterns of conservation and divergence among PLA2s from *S. mimosarum* (KFM82483.1), *L. murina* (WBW70078.1), *S. dumicola* (XP\_035222170.1), *P. tepidariorum* (XP\_071035760.1), *T. clavipes* (GFX25397.1) and *P. suteri* (QHA25180.1). Residue numbering was assigned according to that of LsPLA2-1 (PX396025)

Figure 3. Alignment of LsPLA2-1 with PLA2 sequences from scorpion.



Cysteine residues are marked in yellow, identical amino acids in cyan and conserved residues in gray. Alignment was performed using the catalytic domain sequences, highlighting conservation patterns and sequence divergence between LsPLA2-1 and PLA<sub>2</sub> from *T. melici* (WLF82745.1) and *T. serrulatus* (JAW07019.1). The red square highlights the amino acids of the catalytic site (DXCCXXHD). Residue numbering was assigned according to LsPLA2-1 mature protein.

A minireview by Krayem and Gargouri (2020) summarizes the biochemical properties, structural characteristics, and diverse biological activities of sPLA<sub>2</sub> identified in scorpion venoms<sup>25</sup>. These enzymes predominantly belong to Group III and exhibit a distinctive heterodimeric structure composed of a long enzymatic chain linked to a short chain via a disulfide bond. Despite limited structural and functional studies compared with other venom sPLA<sub>2</sub>, scorpion venom sPLA<sub>2</sub> have demonstrated a range of potent pharmacological effects including neurotoxic<sup>42</sup>,

hemolytic<sup>43</sup>, pro-inflammatory<sup>44</sup> and immunogenic effects<sup>45</sup>. This review highlights the importance of the short chain (a smaller polypeptide subunit covalently linked via a disulfide bond to the longer enzymatic chain of the heterodimeric enzyme) in catalytic efficiency and biological function, including PLA<sub>2</sub> Sm-PLGV from *S. maurus*, whose catalytic activity and kinetic parameters significantly decrease in the absence of the short chain, and its involvement in biological effects such as anti-angiogenic, anti-tumoral, and hemolytic activities. Additionally, this review discusses recombinant expression strategies and underscores the potential of these enzymes as structural templates for the development of novel therapeutic agents with significant biotechnological and pharmacological relevance, as exemplified by their demonstrated anti-angiogenic, anti-tumor, hemolytic, and anticoagulant activities, which highlight their promise as leads for drug discovery and biomedical applications<sup>25</sup>.

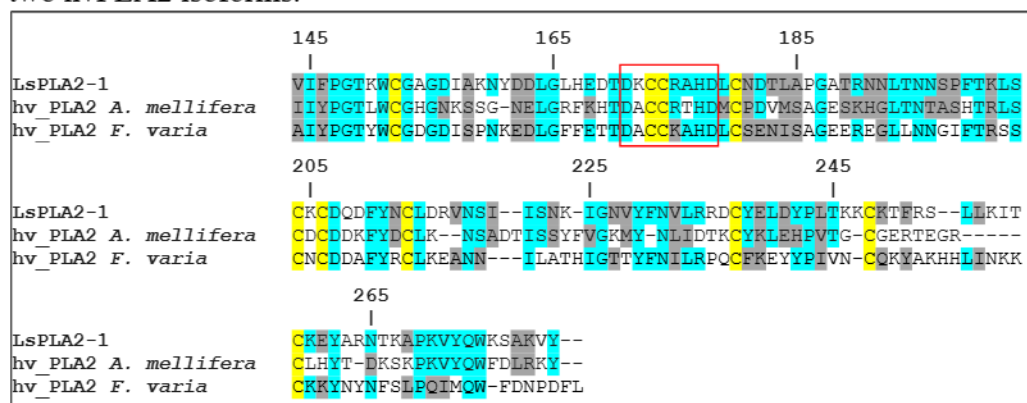
Further analysis using multiple sequence alignments of LsPLA<sub>2</sub>-1 against database-deposited sequences revealed that this enzyme shares numerous conserved residues within its catalytic site with the well-characterized isoforms identified in bees (hvPLA<sub>2</sub>) (Figure 4), indicating a high degree of conservation of cysteine residues within the catalytic site (DXCCXXHD), strong preservation of amino acids in the consensus sequence<sup>19,37</sup>. Bee PLA<sub>2</sub> (hvPLA<sub>2</sub>) is classified as Group IIIA phospholipase. Figure 4 illustrates the alignment of the catalytic domain of LsPLA<sub>2</sub>-1 identified in *L. similis* against hvPLA<sub>2</sub> sequences: *A. mellifera* (Q7M4I5.1) and *Frieseomelitta varia* (XP\_043509018.1), revealing several highly conserved residues, including cysteine residues, which are critical for structural stability and enzymatic function.

Group III PLA<sub>2</sub> enzymes are secreted proteins characterized by a conserved globular structure featuring three  $\alpha$ -helices, two  $\beta$ -wings, a calcium-binding loop at the N-terminus, and an extended C-terminal domain. They possess a catalytic histidine and a specific calcium-binding motif essential for calcium-dependent enzymatic activity. Structural variations in the active site, hydrophobic substrate-binding channel, and C-terminal region distinguish species-specific adaptations

across diverse organisms including insects, scorpions, reptiles, mammals, and aquatic species. Phylogenetic analyses have classified Group III PLA<sub>2</sub> into distinct subgroups reflecting their evolutionary divergence and functional specialization<sup>46</sup>.

A recent study extensively reviewed hvPLA<sub>2</sub> from the venom *A. mellifera*, and highlighted its significant biological and pharmacological importance. PLA<sub>2</sub> in honeybee venom is responsible for multiple toxic and immunological effects, including hydrolysis of phospholipids in cell membranes, release of fatty acids and lysophospholipids that cause cellular damage and inflammation, and act as a bioactive mediator. This enzyme is the primary allergen in the venom, triggering IgE- and IgG-mediated immune responses in humans and serving as a key target for specific immunotherapies<sup>19,21</sup>. Considering that LsPLA<sub>2</sub>-1 from *L. similis* shares several structural characteristics with hvPLA<sub>2</sub> from *A. mellifera*, especially with Group IIIA, it represents a promising molecule for further biochemical and toxicological studies. In contrast, no significant similarity was observed between LsPLA<sub>2</sub>-1 and XV PLA<sub>2</sub> isoforms X1 (XP\_624472.3) and X2 (XP\_006570673.1) from *Apis mellifera*.

Figure 4. Multiple sequence alignment of the catalytic domain of LsPLA<sub>2</sub>-1 and two hvPLA<sub>2</sub> isoforms.



Identical residues are highlighted in cyan blue, and similar amino acids are shown in gray. The conserved cysteine residues are marked in yellow, emphasizing their role in maintaining structural stability. The red square highlights the amino acids of the catalytic site (DXCCXXHD). Residue numbering was assigned according to the LsPLA<sub>2</sub>-1 mature protein. Protein ID: NP\_001011614.1 (*A. mellifera*) and XP\_043509018.1 (*F. varia*).

PLA<sub>2</sub> enzymes from animal venoms have not necessarily evolved to exclusively target mammals; their biological roles often focus on invertebrate taxa, such as insects and isopods. A notable example is the heterodimeric PLA<sub>2</sub> Phaiodactylipin, purified from the venom of *A. phaiodactylus*, which exhibits high toxicity to arthropods, causing lethality at doses as low as 5 µg per cricket (~120 mg) and 3 µg per isopod (~50 mg). In contrast, equivalent or higher doses (up to 20 µg per 20 g mouse) induce only mild local inflammation in mammalian models, without systemic toxicity or disruption of muscle cell basal membranes<sup>22</sup>. These findings emphasize that many conclusions of “no toxic activity” often apply specifically to mammals and do not preclude potent biological effects on insects and other invertebrates, highlighting the functional specialization toward arthropod prey or competitors rather than mammalian targets.

Accurate classification of PLA<sub>2</sub> into specific group (or groups) requires detailed biochemical characterization. Colorimetric assays, enzymatic inhibition, and physiological testing are essential for distinguish endogenous PLA<sub>2</sub>, which is involved in normal cellular functions, from venom-derived PLA<sub>2</sub>, which serves adaptive roles in predation and defense, such as prey digestion and modulation of physiological responses. Therefore, integrating structural, enzymatic, and functional analyses is fundamental to clarify the biological significance of PLA<sub>2</sub> and their contribution to venom-induced toxicity.

The identification of LsPLA<sub>2</sub>-1 in *L. similis* significantly advances the current understanding of the venom composition of this species, given that earlier transcriptomic analyses detected only phospholipase D enzymes, such as the Loxtox family and PLD3-like proteins, as the primary contributors to venom toxicity<sup>27</sup>. Thus, the detection of LsPLA<sub>2</sub>-1 thus introduces a novel enzymatic class into the constellation of *L. similis* venom components, revealing a broader diversity of phospholipase types among *Loxosceles* spiders than previously recognized.

Although PLA<sub>2</sub>-like transcripts have been identified in the venom gland transcriptomes of other spider, such as *P. verdolaga* and *P. boliviensis*, their precise biological contributions remain unclear. The discovery of PLA<sub>2</sub> in *Loxosceles*

suggests a more intricate evolutionary history of venom proteins and raises important new questions for functional and pharmacological research on brown spider toxicity.

Given these findings, it remains unclear whether LsPLA<sub>2</sub>-1 from *L. similis* acts as a venom-secreted toxin, an endogenous enzyme, or both. Typically, secreted PLA<sub>2</sub> is implicated in envenomation mechanisms, contributing to prey immobilization and tissue damage, whereas endogenous PLA<sub>2</sub> participates primarily in cellular processes such as membrane remodeling, signal transduction, and eicosanoid production, and is not directly linked to venom toxicity. Determining the biological context of LsPLA<sub>2</sub>-1 is essential for understanding its functional significance in *L. similis* venom.

## CONCLUSION

In this study, we described the presence of a PLA<sub>2</sub> in the venom glands of *L. similis*, designated as LsPLA<sub>2</sub>-1. This enzyme corresponds to the first PLA<sub>2</sub>-like sequence reported in this species and encodes a full-length protein of 319 amino acids, with a predicted mature form of 295 residues. LsPLA<sub>2</sub>-1 retains conserved cysteine residues critical for disulfide bridge formation and displays catalytic motifs characteristic of the PLA<sub>2</sub> family.

LsPLA<sub>2</sub>-1, classified as either secreted or endogenous PLA<sub>2</sub>, holds significant biological importance due to its distinct physiological roles. Secreted PLA<sub>2</sub> enzymes primarily participate in extracellular processes, such as inflammation and venom toxicity, where they hydrolyze membrane phospholipids to release bioactive lipid mediators that modulate immune responses and contribute to tissue remodeling. In contrast, endogenous (cytosolic) PLA<sub>2</sub> acts within cells to regulate membrane homeostasis, signal transduction, and lipid metabolism, and plays crucial role in cellular function and physiological balance.

Understanding the potential role of LsPLA<sub>2</sub>-1 is essential for elucidating its involvement in normal physiological processes and pathological conditions. These

include its function in venom-induced pathologies and broader biological contexts, highlighting its significance as a prospective therapeutic target for envenomation. Moreover, studying LsPLA<sub>2</sub>-1 structural characteristics provides insight into its enzyme specificity and interactions with cellular membranes. Its role in modulating local and systemic inflammatory responses after venom inoculation underscores its impact on clinical outcomes. The evolutionary conservation and homology of LsPLA<sub>2</sub>-1 across species revealed its essential biological functions and adaptive significance in predation and defense mechanisms. Finally, understanding the possible synergistic interactions between LsPLA<sub>2</sub>-1 and other venom components may lead to development of targeted antivenoms and novel therapies.

### **CONFLICT OF INTEREST**

No conflict of interest was declared by the authors.

### **REFERENCES**

1. World Spider Catalog (2025). World Spider Catalog. Version 26. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch> , accessed on 09/17/2025. Doi: 10.24436/2.
2. Hauke TJ, Herzig V. Dangerous arachnids - Fake news or reality? *Toxicon* vol. 2017; 138. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.024>.
3. Warrell DA. Venomous Bites, Stings, and Poisoning. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2019; 33 (1), 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.001>,
4. Gremski LH, Trevisan-Silva D, Ferrer VP, Matsubara FH, Meissner GO, Wille ACMW, Vuitika L, Dias-Lopes C, Ullah A, Moraes FR, Cháves-Olórtegui C, Barbaro KC, Murakami MT, Arni RK, Senff-Ribeiro A, Chaim OM, Veiga SS. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*. 2014; 83, 91–120. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>.
5. Ministério da Saúde, Departamento de Informática do SUS (DATASUS). (s.d). Animais Brasil - SINAN Tabnet. Ministério da Saúde, online at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def> . Accessed on 09/17/2025.

6. Pereira NB, Campos, PP, Parreiras PM, Chiarini-Garcia H, Socarrás TO, Kalapothakis E, Andrade SP, Moro L. Apoptosis, mast cell degranulation and collagen breakdown in the pathogenesis of loxoscelism in subcutaneously implanted sponges. *Toxicon*. 2014; 84, 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.03.003>.
7. Leal HG, Oliveira Mendes BBR, Horta CCR, Pereira NB, Ferreira DSM, Silva TS, Biscoto GL, Kalapothakis Y, Avila RAM, Chaves-Olórtegui C, Kalapothakis E. Molecular cloning and functional characterization of recombinant Loxtox from *Loxosceles similis* venom. *Int J Biol Macromol*. 2020; 164, 1112-1123. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.190>.
8. Lopes PH, Squaiella-Baptistão CC, Marques MOT, Tambourgi DV. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. *Archives of Toxicology*. 2020; 94, 1461-1477. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02719-0>.
9. Laude M, Lima S, Corsini T, Dussot A, Moniod L, Barjat T, Chauleur C. Cutaneous mammary loxoscelism: An unknown cause of breast inflammation: A case report and review of the literature. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*. 2021; 66(6), 476-480. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2021.09.002>.
10. Gremski LH, Justa HC, Polli NLC, Schluga PHC, Theodoro JL, Wille ACM, Senff-Ribeiro A, Veiga SS. Systemic Loxoscelism, Less Frequent but More Deadly: The Involvement of Phospholipases D in the Pathophysiology of Envenomation. *Toxins*. 2023; 15(1), 17. <https://doi.org/10.3390/toxins15010017>.
11. Okamoto CK, van den Berg CW, Pohl PC, Tambourgi DV. Role of the complement system in kidney cell death induced by *Loxosceles* venom Sphingomyelinases D. *Arch Toxicol*. 2024; 98, 1561-1572. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-024-03711-8>.
12. Tambourgi DV, Petricevich VL, Magnoli FC, Assaf SLMR, Jancar S, da Silva D. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: Pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon*. 1998; 36 (2), 391-403. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00063-9).
13. Okamoto CK, van den Berg CW, Masashi M, Gonçalves-de-Andrade RM, Tambourgi DV. Tetracycline reduces kidney damage induced by *Loxosceles* spider venom. *Toxins*. 2017; 9(3), 90. <https://doi.org/10.3390/toxins9030090>.

14. Luciano MN, da Silva PH, Veiga SS. Experimental Evidence for a Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venom in Renal Tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2004; 52(4). <https://doi.org/10.1177/002215540405200404>.
15. Andrade RMG, Galati EAB, Tambourgi DV. Presença de *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1998 (Araneae: Sicariidae) na Serra da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001; 34(3), 275–277. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000300008>.
16. Machado ÉO, Álvares ÉSS, De Maria M, Kalapothakis E. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana: International Journal of Biodiversity*. 2006; 6(2), 113-115. <https://doi.org/10.35699/2675-5327.2005.22104>.
17. Medina-Santos R, Costa TGF, Assis TCS, Kalapothakis Y, Limas SA, do Carmo AO, Gonzalez-Kozlova EE, Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C, Guerra-Duarte CL. Analysis of NGS data from Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom gland reveals toxin diversity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics Proteomics*. 2022; 43. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2022.101017>.
18. Soltan-Alinejad P, Alipour H, Meharabani D, Azizi K. Therapeutic Potential of Bee and Scorpion Venom Phospholipase A2 (PLA2): A Narrative Review. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2022; 47(4), 300-3123. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35919080>.
19. Muntean M, Florea A. Phospholipase A2 - A Significant Bio-Active Molecule in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Venom. *Molecules*. 2025; 30(12), 2623. <https://doi.org/10.3390/molecules30122623>.
20. Silva-Magalhães R, dos Santos AM, Silva-Araújo AL, Peres-Damásio PL, Alvarenga VG, de Oliveira LS, Sanchez EF, Chávez-Olórtegui C, Varela LSRN, Paiva ALB, Guerra-Duarte C. Venom from *Loxosceles* Spiders Collected in Southeastern and Northeastern Brazilian Regions Cause Hemotoxic Effects on Human Blood Components. *Toxins*. 2024; 16(12), 532. <https://doi.org/10.3390/toxins16120532>.
21. Jin G, Hrithik TH, Mandal E, Kil EJ, Kim Y. Phospholipase A2 activity is required for immune defense of European (*Apis mellifera*) and Asian (*Apis cerana*) honeybees against American foulbrood pathogen, *Paenibacillus* larvae. *PLoS One*. 2024; 19(2): e0290929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290929>.

22. Valdez-Cruz NA, Batista CVF, Possani LD. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur J Biochem.* 2004; 271(8), 1453-1464. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04047.x>.
23. Incamnoi P, Patramanon R, Thammasirirak S, Chaveerach A, Uawonggul N, Sukprasert S, Rungsa P, Daduang J, Daduang S. Heteromtxin (HmTx), a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon.* 2013; 61, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.012>.
24. Louati H, Krayem N, Fendri A, Aissa I, Sellami M, Bezzine S, Gargouri Y. A thermoactive secreted phospholipase A2 purified from the venom glands of *Scorpio maurus*: Relation between the kinetic properties and the hemolytic activity. *Toxicon.* 2013; 72, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.017>.
25. Krayem N, Gargouri Y. Scorpion venom phospholipases A2: A minireview. *Toxicon.* 2020; 184, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.020>.
26. Estrada-Gomez S, Muñoz LJV, Lanchero P, Latorre CS. Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* (Araneae:Ctenidae). *Toxins.* 2015; 7(8), 2872-2887. <https://doi.org/10.3390/toxins7082872>.
27. Dantas AE, Carmo AO, Horas CCR, Leal HG, Oliveira-Mendes BBR, Martins APV, Chávez-Olórtegui C, Kalapothakis E. Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland. *Toxicon.* 2016; 120, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.002>.
28. Gertsch WJ. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bulletin of the AMNH.* 1967; 136(3), 170-173. <http://hdl.handle.net/2246/1989>.
29. Da Silveira RB, Filho JFS, Mangili OC, Veiga SS, Gremski W, Nader HB, von Dietrich CP. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon.* 2002; 40(6), 815-822. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00078-8).
30. Kalapothakis Y, Miranda K, Pereira AH, Witt ASA, Marani C, Martins AP, Leal HG, Chávez-Olórtegui C, Kalapothakis E. Novel components of *Tityus serrulatus* venom: A transcriptomic approach. *Toxicon.* 2021; 189, 91-104. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.11.001>.
31. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 2009; 23, 49-59. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>.

32. Kalapothakis YV, Kalapothakis E. (2021). Novos componentes do veneno de *Tityus serrulatus*: uma abordagem transcriptômica [Master's dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais]. Programa de Pós Graduação em Genética, Belo Horizonte, Brazil. <https://www.pggenetica.icb.ufmg.br/defesas/449M.PDF?src=12299>.
33. Fremont, DH, Anderson DH, Wilson IA, Dennis EA, Xuong NH. Crystal structure of phospholipase A2 from Indian cobra reveals a trimeric association. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993; 90(1), 342–346 <https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.342>.
34. Stahelin RV, Subramanian P, Vora M, Cho W, Chalfant CE. Ceramide-1-phosphate Binds Group IVA Cytosolic Phospholipase a2 via a Novel Site in the C2 Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(28), 20467–20474 <https://doi.org/10.1074/jbc.M701396200>.
35. Tang J, Kriz RW, Wolfman N, Shaffer M, Seehra J. A Novel Cytosolic Calcium-independent Phospholipase A2 Contains Eight Ankyrin Motifs. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(13), 8567–8575. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8567>.
36. Estrada-Gómez S, Vargas-Muñoz LJ, Latorre CS, Saldarriaga-Cordoba MM Arenas-Gómez CM. Analysis of high molecular mass compounds from the spider *Pamphobeteus verdolaga* venom gland. A transcriptomic and MS ID approach. *Toxins*. 2021; 13(7), 453. <https://doi.org/10.3390/toxins13070453>.
37. Ivanušec A, Šribar J, Križaj I. Secreted Phospholipases A2 – not just Enzymes: Revisited. *International Journal of Biological Sciences*. 2022; 18(2), 873-888. <https://doi.org/10.7150/ijbs.68093>.
38. Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating phospholipase A2 biology. *Biomolecules*. 2020; 10(10), 1457. <https://doi.org/10.3390/biom10101457>.
39. Zambelli VO, Picolo G, Fernandes CAH, Fontes MRM, Cury Y. Secreted phospholipases A2 from animal venoms in pain and analgesia. *Toxins*. 2017; 9(12), 406. <https://doi.org/10.3390/toxins9120406>.
40. Estrada-Gómez S, Vargas-Muñoz LJ, Segura Latorre C, Saldarriaga-Cordoba MM, Arenas-Gómez CM. Analysis of High Molecular Mass Compounds from the Spider *Pamphobeteus verdolaga* Venom Gland. A Transcriptomic and MS ID Approach. *Toxins*. 2021; 13(7), 453 <https://doi.org/10.3390/toxins13070453>.

41. Kalapothakis Y, Miranda K, Aragão M, Larangote D, Braga-Pereira G, Noetzold M, Molina D, Langer R, Conceição IM, Guerra-Duarte C, Chávez-Olórtegui C, Chávez-Olórtegui C, Kalapothakis E, Borges A. Divergence in toxin antigenicity and venom enzymes in *Tityus melici*, a medically important scorpion, despite transcriptomic and phylogenetic affinities with problematic Brazilian species. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024; 263(2), 130311. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130311>.
42. Soltan-Alinejad P, Alipour H, Soltani A, Asgari Q, Ramezani A, Mehrabani D, Azizi K. Molecular Characterization and in Silico Analyses of Maurolipin Structure as a Secretory Phospholipase A2 (sPLA2) from Venom Glands of Iranian *Scorpio maurus* (Arachnida: Scorpionida). *Journal of Tropical Medicine*. 2022; 2022(1). <https://doi.org/10.1155/2022/1839946>.
43. Estrada-Gómez S, Vargas Muñoz LJ, Saldarriaga-Córdoba M, Quintana Castillo JC. Venom from *Opisthacanthus elatus* scorpion of Colombia, could be more hemolytic and less neurotoxic than thought. *Acta Tropica*. 2016; 153, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.019>.
44. Salabi F, Jafari H. Whole transcriptome sequencing reveals the activity of the PLA2 family members in *Androctonus crassicauda* (Scorpionida: Buthidae) venom gland. *FASEB J*. 2024; 38(10): e23658. <https://doi.org/10.1096/fj.202400178RR>.
45. Najafi M, Shahbazzadeh D, Yaghmaie P, Mirzahoseini H. Biochemical characterization and activity profiling of recombinant phospholipase A2 from *Hemiscorpius lepturus* expressed in *E. coli* with in vivo antibody response. *Sci Rep*. 2025; 15: 14609. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-98261-z>.
46. Hariprasad G, Srinivasan A, Singh R. Structural and phylogenetic basis for the classification of group III phospholipase A2. *J Mol Model*. 2013; 19, 3779–3791. <https://doi.org/10.1007/s00894-013-1913-x>.