

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

**Produção e caracterização funcional de novas isoformas de
fosfolipase D recombinantes da aranha *Loxosceles similis***

ALUNA: Hortênsia Gomes Leal

ORIENTADOR: Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte

Setembro 2021

Hortênsia Gomes Leal

Produção e caracterização funcional de novas isoformas de fosfolipase D recombinantes da aranha *Loxosceles similis*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Genética

Orientador: Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte

2021

043 Leal, Hortênsia Gomes.
Produção e caracterização funcional de novas isoformas de fosfolipase D recombinantes da aranha *Loxosceles similis* [manuscrito] / Hortênsia Gomes Leal. – 2021.

118 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. Venenos de Aranha. 4. Fosfolipases. 5. Soro. 6. Antivenenos. I. Kalapothakis, Evanguedes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Produção e caracterização funcional de novas isoformas de fosfolipase D recombinantes da aranha *Loxosceles similis*"

Hortênsia Gomes Leal

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Evanguedes Kalapothakis
UFMG

Marília Martins Melo
UFMG

Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG

Clara Guerra Duarte
FUNED

Luciana Maria Silva
FUNED

Belo Horizonte, 10 de setembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Clara Guerra Duarte, Usuário Externo**, em 10/09/2021, às 15:30, 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 **Marília Martins Melo, Professora do Magistério Superior**, em 10/09/2021, às 18:47, 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 **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 14/09/2021, às 11:10, 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, Presidente**, em 15/09/2021, às 10:47, 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 **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 15/09/2021, às 10:57, 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, informando o código verificador **0952739** e o código CRC **1C272B69**.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

- Departamento de Genética, Ecologia e Evolução – ICB – UFMG**
- Programa de Pós Graduação em Genética do ICB – UFMG**
- Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG**
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG**
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**
- Parque estadual do Sumidouro MG Instituto Estadual de Florestas – IEF**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Evanguedes Kalapothakis pela oportunidade de ter trabalhado em sua equipe e pela orientação ao longo de todos esses anos.

As agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo financiamento deste projeto.

Ao Departamento de Pós Graduação em Genética, as secretárias pelo excelente apoio em todos os momentos de necessidade. Aos professores e colegas do departamento.

Aos membros e aos ex-membros do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares: Bárbara, Carolina, Thais, Nazaré, Anderson, Arthur, Ana Paula, Ana Luiza, Gabriela, Douglas, Pedro, Ricardo, Yan, Aline, Dani, Leo, Bruno, Alessandra, Adriana, Susanne, Grécia, Marcos e a todos os demais com os quais eu convivi e trabalhei desde a Iniciação Científica. Obrigado pela convivência, pela colaboração, ajuda e excelentes momentos que passamos juntos.

Aos técnicos do departamento de Bioquímica, Jamil e Adriana que me auxiliaram em diversos momentos, muito obrigada pela ajuda!

Ao professor Carlos Chavez por disponibilizar seu tempo e seu laboratório em vários momentos. Agradeço a Sabrina, Dayane, Denis e Carol do departamento de bioquímica e Andressa e Rodrigo do departamento de fisiologia pela paciência e pela ajuda com alguns experimentos deste trabalho. Ao professor Ricardo A. M. Ávila da Universidade do Extremo Sul Catarinense pela síntese da membrana de Spot.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite.

Gostaria de agradecer a Deus e a minha família por serem sempre meu suporte em todos os momentos.

Resumo

O loxoscelismo é um problema de saúde pública no Brasil, mas o veneno da aranha *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898), que é uma espécie de importância médica e apresenta grande capacidade de se adaptar ao ambiente urbano, ainda é pouco caracterizado. Loxtox é uma família de enzimas fosfolipase D (PLD) que são o principal componente do veneno de *Loxosceles* e são responsáveis pelos efeitos clínicos do loxoscelismo. As toxinas Loxtox correspondem a 15% dos transcritos das glândulas de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), no entanto, a família Loxtox de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) ainda não foi totalmente caracterizada. Assim, este projeto teve como objetivo a caracterização funcional de Loxtox recombinantes e a análise da capacidade imunogênica das toxinas para a obtenção de anticorpos capazes de neutralizar os efeitos provocados pelo veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). Dessa forma, foram clonadas e caracterizadas duas toxinas Loxtox recombinantes, a recLoxtox s1A e a recLoxtox s11A. Ambas as toxinas recombinantes mostraram atividade *in vitro* dependendo do pH e a recLoxtox s1A causou efeitos mais intensos na pele de coelhos nos testes *in vivo* do que a recLoxtox s11A. Ambas as toxinas recombinantes foram usadas em protocolos de imunização e epítomos mapeados nas toxinas recombinantes mostraram reações imunogênicas diferentes para os soros produzidos. Ainda, os anticorpos policlonais gerados contra a recLoxtox s1A apresentou maior potencial para reduzir significativamente os efeitos *in vitro* e *in vivo* do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). Assim, foram obtidas e caracterizadas duas novas isoformas de Loxtox do veneno de *L. similis*, as quais podem ser valiosas ferramentas biotecnológicas e imunológicas contra o loxoscelismo.

Palavras-chave: Loxtox, fosfolipases D, *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898), loxoscelismo, toxina recombinante, soro

Abstract

Loxoscelism is a recognized public health problem in Brazil, but the venom from *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898) spider, which is widespread in Brazil due to its adaptability to the urban environment, remains poorly characterized. Loxtox is a family of phospholipase D enzymes (PLDs), which are the major components of *Loxosceles* venom and are responsible for the clinical effects of loxoscelism. Loxtox toxins correspond to 15% of *L. similis* (Moenkhaus, 1898) venom gland transcripts, but the Loxtox family of *L. similis* (Moenkhaus, 1898) has yet to be fully described. In this study, we aimed the functional characterization of recombinant Loxtox and to analyze their immunological properties in order to obtain antibodies able to neutralize the effects evoked by *L. similis* (Moenkhaus, 1898) venom. Thus, we cloned and functionally characterized recLoxtox s1A and recLoxtox s11A. These recombinant toxins exhibited different *in vitro* activities depending on pH, and recLoxtox s1A had more intense effects on rabbit skin than did recLoxtox s11A *in vivo*. Both recombinant toxins were used in immunization protocols, and mapping of their epitopes revealed different immunological reactions for the produced immune serums. Additionally, polyclonal antibodies raised against recLoxtox s1A had greater capacity to significantly reduce the *in vitro* and *in vivo* effects of *L. similis* (Moenkhaus, 1898) venom. In summary, we obtained and characterized two novel Loxtox isoforms from *L. similis* (Moenkhaus, 1898) venom, which may be valuable biotechnological and immunological tools against loxoscelism.

Keywords: Loxtox, phospholipases D, *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898), loxoscelism, recombinant toxin, serum

Índice de figuras

FIGURA 1 Aranha <i>Loxosceles similis</i> (Moenkhaus, 1898).....	15
FIGURA 2 Distribuição mundial das espécies registradas de aranhas <i>Loxosceles</i> , com variação entre 1 a 41 espécies/país.....	18
FIGURA 3 Epidemiologia dos acidentes com aranhas no Brasil entre os anos de 2007 a 2019.....	20
FIGURA 4 Progressão do Loxoscelismo cutâneo e sistêmico.....	22
FIGURA 5 Árvore com os 12 subgrupos de Loxtox encontradas no transcriptoma da glândula de veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898).....	35
FIGURA 6 Resíduos do sítio catalítico e diferenças na topologia e estrutura das fosfolipases D de classe I e classe II.	37
FIGURA 7 Mapa dos vetores utilizados... ..	15
FIGURA 8 Sequências de aminoácidos deduzidas das toxinas recombinantes.....	60
FIGURA 9 Alinhamento múltiplo das sequências maduras de Loxtox s1A e Loxtox s11A com PLDs de outras espécies de <i>Loxosceles</i>	15
FIGURA 10 Expressão e purificação de toxinas recombinantes analisadas usando SDS-PAGE 12% sob condições redutoras.	61
FIGURA 11 Atividade enzimática das toxinas recombinantes recLoxtox s1A (10 µg) e recLoxtox s11A (10 µg) sob diferentes condições de pH.	62
FIGURA 12 Caracterização da atividade macroscópica das toxinas recombinantes.....	64
FIGURA 13 Caracterização da atividade histopatológica das toxinas recombinantes.....	69
FIGURA 14 Análise morfométrica do infiltrado inflamatório.....	71
FIGURA 15 Análises histológicas das lesões após exposição a toxinas recombinantes e veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898).....	71
FIGURA 16 Resposta imunogênica das toxinas recombinantes.	71
FIGURA 17 Análise de SPOT dos epítomos da recLoxtox s1A.....	71
FIGURA 18 Análise de SPOT dos epítomos da recLoxtox s11A.....	71
FIGURA 19 Peptídeos imunogênicos das toxinas recombinantes.	76
FIGURA 20 Modelagem molecular e mapeamento de epítomos das toxinas recombinantes	78
FIGURA 21 Neutralização da atividade de esfingomielinase do veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898).....	80
FIGURA 22 Neutralização <i>in vivo</i> da atividade do veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898).	83
FIGURA 23 Análises histológicas e morfométricas da proteção <i>in vivo</i> induzida por soros imunes... ..	15
FIGURA 24 Neutralização <i>in vivo</i> do infiltrado inflamatório	87

Índice de tabelas

TABELA 1 Esquema de injeções intradérmicas para análise de caracterização <i>in vivo</i>	54
TABELA 2 Esquema de injeções intradérmicas para análise de neutralização <i>in vivo</i>	55

Lista de abreviaturas

3D	Tridimensional
A	Alanina
BLASTP	Do inglês “Basic Local Alignment Search Tool for Protein”
BSA	Albumina de soro bovino
C	Cisteína
CaV	Canal voltagem-dependente para cálcio
CC(1,3)P	Ceramida cíclica
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
CeTICs	Centro de Toxinas, Resposta-imune e Sinalização Celular
CEUA/UFMG	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais
CIP	Ceramida-1-fosfato
cPA	Ácido fosfatídico cíclico
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
CXCL	Quiocinas inflamatórias
D	Ácido aspártico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E	Ácido glutâmico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
EST	Do inglês “Expressed sequence tag”
ExpPASy	Do inglês “Expert Protein Analysis System”
F	Fenilalanina
FAPESP	Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo
FDA	Do inglês “Food and drug administration”
G	Glicina
GDPD	Do inglês “Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase domain”
H	Histidina
His-tag	Cauda de histidina
I	Isoleucina

ICK	Do inglês “Inhibitor Cystine Knot”
IEF/MG	Instituto Estadual de Florestas do estado de Minas Gerais
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
K	Lisina
kDa	Kilodaltons
Ki	Constante de inibição
L	Leucina
LALLT	Do inglês “Loxosceles Allergen-Like Toxin”
LaSicTox_ β ID1	Fosfolipase D recombinante de <i>Loxosceles arizonica</i> (Gertsch & Mulaik, 1940)
Lb3	Fosfolipases D recombinante de <i>Loxosceles boneti</i> (Gertsch, 1958)
LgRec1	Fosfolipases D recombinante de <i>Loxosceles gaucho</i> (Gertsch, 1967)
LgRecDT1	Fosfolipases D recombinante de <i>Loxosceles gaucho</i> (Gertsch, 1967)
LIBSI	Do inglês “Ligand-induced binding site I”
LiD1	Fosfolipase D recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i> (Mello-Leitão, 1934)
LiRecDT1	Fosfolipase D recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i> (Mello-Leitão, 1934)
LiRecDT3	Fosfolipase D recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i> (Mello-Leitão, 1934)
LiRecDT1	Fosfolipase D recombinante de <i>Loxosceles laeta</i> (Nicolet, 1849)
LM	Modelo estatístico de regressão linear
LME	Modelo estatístico misto linear
Loxtox	Do inglês “ <i>Loxosceles</i> toxins”
LPA	Ácido lisofosfatídico
Lr2	Fosfolipases D recombinante de <i>Loxosceles reclusa</i> (Gertsch & Mulaik, 1940)
M	Metionina
mAbs	Anticorpo monoclonal
Mg ²⁺	Íon magnésio
MMP	Metaloproteinases da Matriz

N	Asparagina
NaV	Canal voltagem-dependente para sódio
NGS	Do inglês “Next-generation sequencing”
NPWT	Do inglês “Negative-pressure wound therapy”
O ₂	Oxigênio
P	Prolina
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PLD	Fosfolipase D
QMEAN	Do ingles “Qualitative Model Energy Analysis”
rCpLi	Quimera recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i> (Mello-Leitão, 1934)
rMEPLox	Quimera recombinante de <i>Loxosceles</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de ácido ribonucleico
S	Serina
S.E.M.	Erro padrão da média
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SicTox	Do inglês “Sicariidae toxin”
SMAseD	Esfingomielinase D
StSicTox_βIB1i	Fosfolipase D recombinante de <i>Sicarius terrosus</i> (Nicolet, 1849)
T	Treonina
TBS	Tampão Tris salina
TBST	Tampão Tris salina, 0,1% Tween
TCTP	Do inglês “Translationally Controlled Tumor Protein”
TPE	Terapia de troca plasmática
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina
γ-H2AX	Histona γ-H2AX

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. Aranhas <i>Loxosceles</i>	15
1.2. Acidentes com aranhas <i>Loxosceles</i> e loxoscelismo	18
1.2.1. Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo	22
1.3. Veneno de <i>Loxosceles</i>	26
1.3.1. Veneno de <i>Loxosceles similis</i> (Moenkhaus, 1898)	30
1.4. Fosfolipases D de <i>Loxosceles</i>	31
1.4.1. Atividade bioquímica e estrutura das Fosfolipases D de <i>Loxosceles</i>	35
1.4.2. Aplicações no diagnóstico e na terapia do loxoscelismo	38
1.4.3. Busca e desenvolvimento de inibidores específicos.....	40
1.4.4. Aplicações Biotecnológicas.....	41
2. Justificativa e relevância	43
3. Objetivos.....	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. Material e Métodos.....	44
4.1 Aranhas e veneno	44
4.2 Animais e declarações éticas	45
4.3 Clonagem de toxinas recombinantes.....	45
4.4 Alinhamento múltiplo	48
4.5 Expressão e purificação de toxinas recombinantes	48
4.6 Eletroforese	49
4.7 Protocolos de imunização.....	49
4.8 Imunoensaios	50
4.8.1 ELISA.....	50
4.8.2 <i>Western-blotting</i>	50
4.8.3 Síntese de peptídeos na membrana de celulose pelo método de Spot.....	51
4.8.4 Imunoensaios de Spot	51
4.9 Modelagem molecular	52
4.10 Atividade da esfingomielinase e ensaio de neutralização <i>in vitro</i>	52
4.11 Efeitos cutâneos de toxinas recombinantes e neutralização <i>in vivo</i> do veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898).....	53

4.12 Análises macroscópicas, histológicas e morfológicas.....	55
4.13 Análises estatísticas dos dados.....	56
5. Resultados.....	56
5.1 Sequências das toxinas recombinantes e alinhamento múltiplo	56
5.2 Expressão e purificação das toxinas recombinantes	60
5.3 Atividade esfingomielinásica das toxinas recombinantes.....	61
5.4 Efeitos <i>in vivo</i> das toxinas recombinantes	62
5.3 Atividade imunogênica das toxinas recombinantes.....	70
5.3.1 ELISA.....	70
5.3.2 Imunoensaios de SPOT	72
5.4 Modelagem molecular	77
5.5 Neutralização dos efeitos do veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898).....	79
5.5.1 Neutralização <i>in vitro</i>	79
5.5.1 Neutralização <i>in vivo</i>	81
6. Discussão	88
6.1. Comparações das sequências e caracterização funcional das toxinas recombinantes	88
6.2. Propriedades imunológicas e moleculares.....	91
7. Conclusão.....	92
8. Perspectivas.....	93
9. Referências	94
10. Anexos	115
Anexo 1 FIGURA A 1 Injeção de 10 µl de veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898) em pele de coelho.)	115
Anexo 2 FIGURA A 2 <i>Western-blotting</i> das toxinas recombinantes e do veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898).....	115
Anexo 3 FIGURA A 3 Validação e análise de qualidade do modelos gerado para recLoxtox s1A.....	116
Anexo 4 FIGURA A 4 Validação e análise de qualidade do modelos gerado para recLoxtox s11A.....	117
Anexo 5 Trabalhos publicados durante o período de realização do doutorado.....	118

1. Introdução

1.1. Aranhas *Loxosceles*

Aranhas do gênero *Loxosceles* juntamente com o gênero *Sicarius* pertencem à família Sicariidae. Nos últimos anos foram descritas 141 espécies de aranhas *Loxosceles*, sendo que outras 19 espécies foram descritas como sinônimos de espécies já existentes (Platnick, 2021). Entre as diferentes espécies descritas, 109 são encontradas nas Américas, sendo que no Brasil há 19 espécies de aranhas *Loxosceles* (Platnick, 2021; Oliveira-Mendes et al., 2020). As similaridades morfológicas das aranhas *Loxosceles*, como a tonalidade amarronzada, a presença de uma mancha em formato de violino no cefalotórax, pernas longas e finas e três pares de olhos dispostos em díades são características deste gênero (**FIGURAS 1 A, B**). Tais características lhes conferem os nomes comuns de “aranha marrom” ou “aranha violino” (Gertsch, 1967; Vetter e Visscher, 1998).

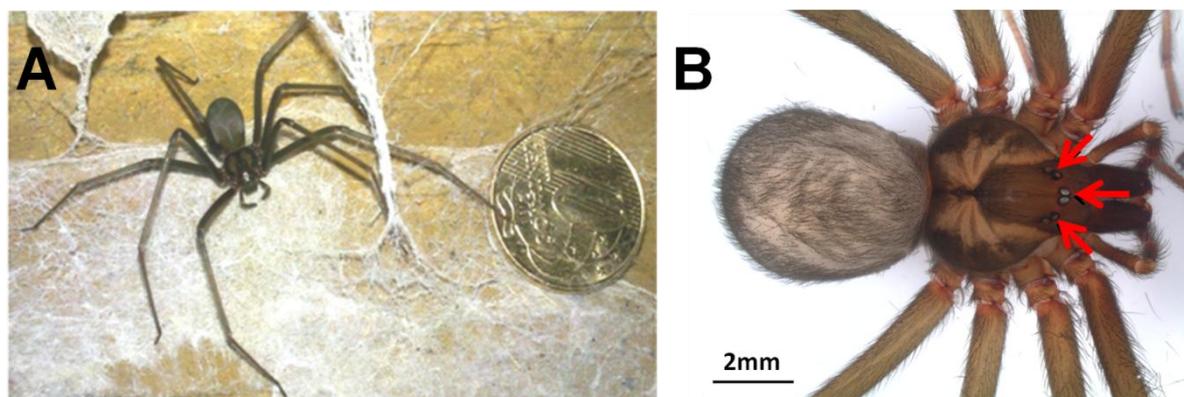


FIGURA 1 Aranha *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898). **A)** *L. similis* (Moenkhaus, 1898) localizada na Gruta da Lapinha no Parque Estadual do Sumidouro no município de Lagoa Santa, MG (Fonte: Anderson do Carmo, arquivo pessoal). **B)** Vista dorsal *L. similis* (Moenkhaus, 1898) fêmea, setas vermelhas destacando os três pares de olhos dispostos em díades e a mancha em formato de violino no cefalotórax (Fonte: Bárbara Teixeira Faleiro, Belo Horizonte, Brasil, 2019).

Baseando-se em características morfológicas, *Loxosceles* foram classificadas em nove grupos localizados na América do Norte (*Loxosceles reclusa* (Gertsch & Mulaik, 1940)) América do Sul (*Loxosceles gaucho* (Gertsch, 1967), *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849), *Loxosceles amazonica* (Gertsch, 1967), *Loxosceles spadicea* (Simon, 1907), *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão, 1934)), África do Sul (*Loxosceles vonwredei* (Newlands, 1980), *Loxosceles spinulosa* (Purcell, 1904)) e no Mediterrâneo (*Loxosceles rufenses* (Dufour, 1820)) (Gertsch e Ennik, 1983; Gertsch 1967; Newlands e Atkinson, 1988; Nentwig et al., 2017). Várias outras espécies de *Loxosceles* foram descritas em todo o mundo (**FIGURA 2**; Platnick, 2021). As *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898) foram classificadas através de análises morfológicas dentro do grupo *gaucho* e análises citogenéticas também evidenciaram similaridades entre os cromossomos de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e *Loxosceles variegata* (Simon, 1897), todas pertencentes ao mesmo grupo com $2n= 23$, incluindo cromossomos sexuais (X_1X_2Y) (Gertsch 1967; Araujo et al., 2020). A diversidade dos grupos é maior em latitudes de clima temperado e tropical, principalmente nas Américas (Norte, Central e Sul) e na África (Platnick, 2021). A distribuição das *Loxosceles* também abrange em menor quantidade a Europa, Ásia e Oceania (**FIGURA 2**; Platnick, 2021). A distribuição dessas aranhas ocorre de forma nativa ou através da introdução por atividades humanas, dessa forma, há registros isolados de diferentes espécies que se tornaram “cosmopolitas” por interferência humana, por exemplo, existem registros da presença das espécies *L. rufenses* (Dufour, 1820), *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. gaucho* (Gertsch, 1967) em diferentes continentes (**FIGURA 2**; Nentwig et al., 2017; Platnick, 2021). Além disso, Binford e colaboradores (2008), através de análises filogenéticas, demonstraram a relação monofilética entre alguns grupos e evidenciaram que a diversidade e a distribuição dos grupos de *Loxosceles* são consistentes com uma origem na Gondwana Ocidental, em um período anterior a separação da África e da América do Sul. Planas e Ribeira (2014, 2015) também discutem que é necessária uma caracterização mais completa da distribuição dessas aranhas.

Na natureza, as *Loxosceles* apresentam comportamento sedentário e pouco agressivo, sendo encontradas em locais escuros como cavernas, cascas de árvores, pedras e folhas (Gertsch, 1967; Bertani et al., 2018). Essas aranhas predam e

praticam a necrofagia de outros artrópodes, incluído insetos grandes ou pequenos, pseudoescorpiões, aranhas e diplópodos (Fischer et al., 2006; Souza-Silva e Ferreira, 2014). A diminuição da disponibilidade de presas tem sido correlacionada ao canibalismo e à mobilidade de aranhas *L. similis* (Moenkhaus, 1898) para outros ambientes (Ferreira et al., 2005). Também foi observado que as aranhas *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) apresentam grande capacidade de dispersão e alta tolerância à privação de água e alimento (Fischer e Vasconcellos-Neto, 2005). Desse modo, a capacidade de expansão territorial dessas aranhas associado à mudança em seu habitat natural e outros fatores ecológicos são aspectos pertinentes relacionados com a colonização sinantrópica de áreas urbanas por essas aranhas, o que tem sido exemplificado pelos achados de *L. laeta* (Nicolet, 1849), *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), *L. similis* (Moenkhaus, 1898) e outras espécies de *Loxosceles* em áreas urbanas, incluindo o interior de residências dos municípios de Curitiba e Belo Horizonte (Machado et al., 2005; Fischer e Vasconcellos-Neto, 2005; Oliveira-Mendes et al., 2020).

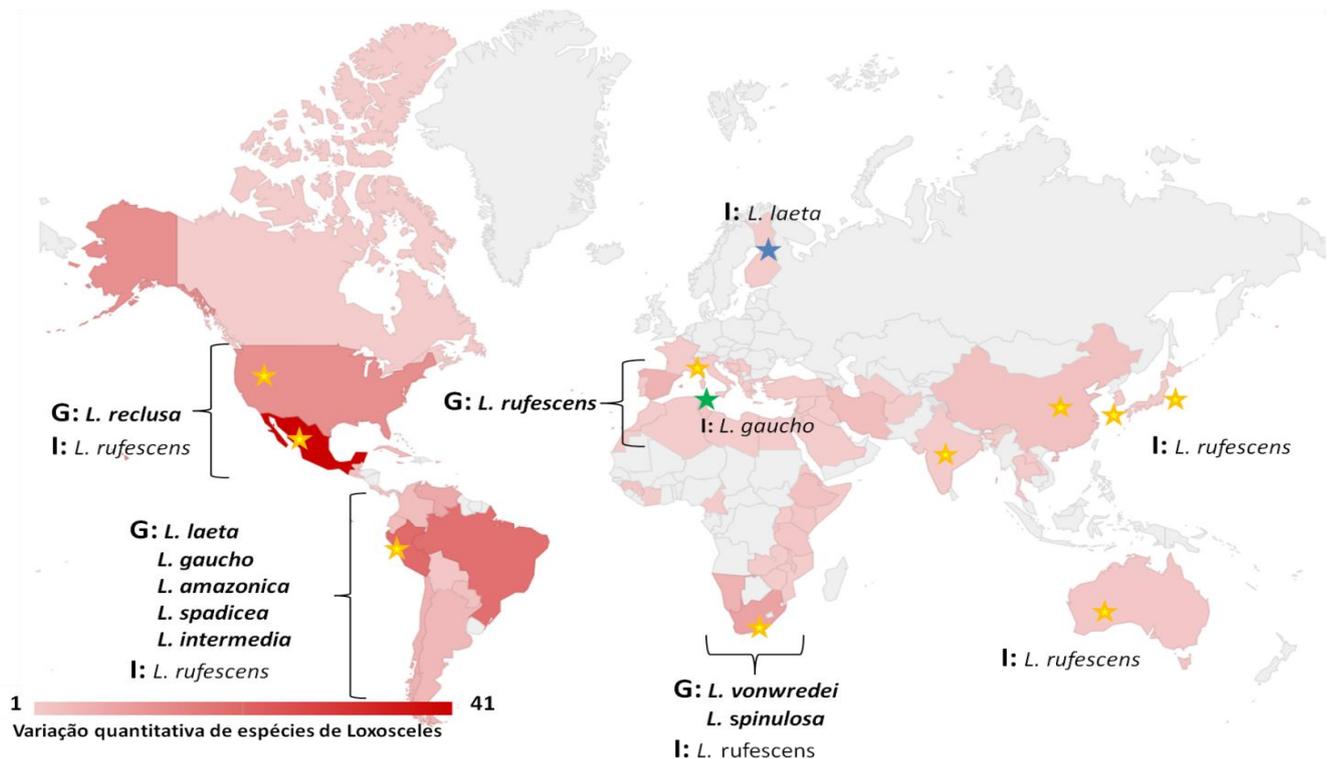


FIGURA 2 Distribuição mundial das espécies registradas de aranhas *Loxosceles*, com variação entre 1 a 41 espécies/país. **G:** localização dos nove grupos de *Loxosceles* definidos por análises morfológicas (destacados em negrito). **I:** localização das espécies introduzidas (estrelas amarelas: *L. rufescens* (Dufour, 1820), estrela azul: *L. laeta* (Nicolet, 1849), estrela verde: *L. gaucho* (Gertsch, 1967)). (Adaptado de Platnick, 2021 e Binford et al., 2008)

1.2. Acidentes com aranhas *Loxosceles* e loxoscelismo

O veneno produzido por aranhas *Loxosceles* é capaz de provocar sinais e sintomas conhecidos como loxoscelismo. Acidentes com essas aranhas foram registrados em diversas regiões do mundo. Em alguns países localizados na Europa, Ásia e África os registros de casos clínicos são menos frequentes e alguns foram feitos sem a captura e/ou correta identificação das aranhas, comprometendo a real epidemiologia do loxoscelismo nessas regiões (Nentwig et al., 2017). Em comparação, existe uma vasta literatura a respeito de acidentes provocados por *Loxosceles* de diferentes espécies nas Américas, o que pode estar relacionado à diversidade de espécies de *Loxosceles* presente nesses continentes, bem com a

supernotificação de casos em decorrência de diagnósticos sem a captura do espécime (Nentwig et al., 2017; Oliveira-Mendes et al., 2020).

No Brasil, o loxoscelismo é um problema de saúde pública, sendo que representa 40% dos acidentes com aranhas notificados em todo o país entre os anos de 2007 a 2019 e tem uma média de mais de 8.000 casos por ano (**FIGURAS 3 A, B**; Ministério da Saúde, 2021). As espécies de importância clínica presentes no Brasil incluem *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), *L. laeta* (Nicolet, 1849), *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e a *L. similis* descrita por Moenkhaus em 1988 (Chaves-Moreira et al., 2017; Malaque et al., 2017; Oliveira-Mendes et al., 2020). Historicamente os casos de loxoscelismo são elevados na região Sul do país, entretanto entre o período de 2007 a 2019 nota-se um aumento do número de casos nas demais regiões, principalmente na região Sudeste (**FIGURA 3 B**; Ministério da Saúde, 2021; Oliveira-Mendes et al., 2020).

A picada das aranhas *Loxosceles* é indolor e os primeiros sinais clínicos do loxoscelismo podem aparecer nas primeiras duas a oito horas após o envenenamento, levando a subseqüentes alterações cutâneas associadas ou não a implicações sistêmicas (Hogan et al., 2004; Ibister e Fan, 2011). Os acidentes ocorrem principalmente quando as aranhas são acidentalmente pressionadas contra o corpo, sendo que as picadas ocorrem com mais frequência nos membros inferiores (39,7%), seguido pelos membros superiores (21,5%), torso (18,2%), cabeça e pescoço (15,7%) (Malaque et al., 2017; Lopes et al., 2020). As taxas de mortes por loxoscelismo são baixas, entre 2007 a 2019 foram 72 óbitos registrados em decorrência de agravos do envenenamento, entretanto os efeitos cutâneos e sistêmicos do loxoscelismo podem levar a sérias sequelas e complicações, como a falência renal aguda (Ministério da Saúde, 2021; Lopes et al., 2020). Diferentes fatores contribuem para a intensidade dos efeitos do loxoscelismo, incluindo a quantidade de veneno injetado, a diferença da toxicidade entre os venenos, a ocorrência de infecções secundárias e as características genéticas e fisiológicas da vítima, incluindo a presença de comorbidades como diabetes tipo 2, hipertensão e carcinoma (de Oliveira et al., 2005; Albuquerque et al., 2018, Tormos et al., 2019).

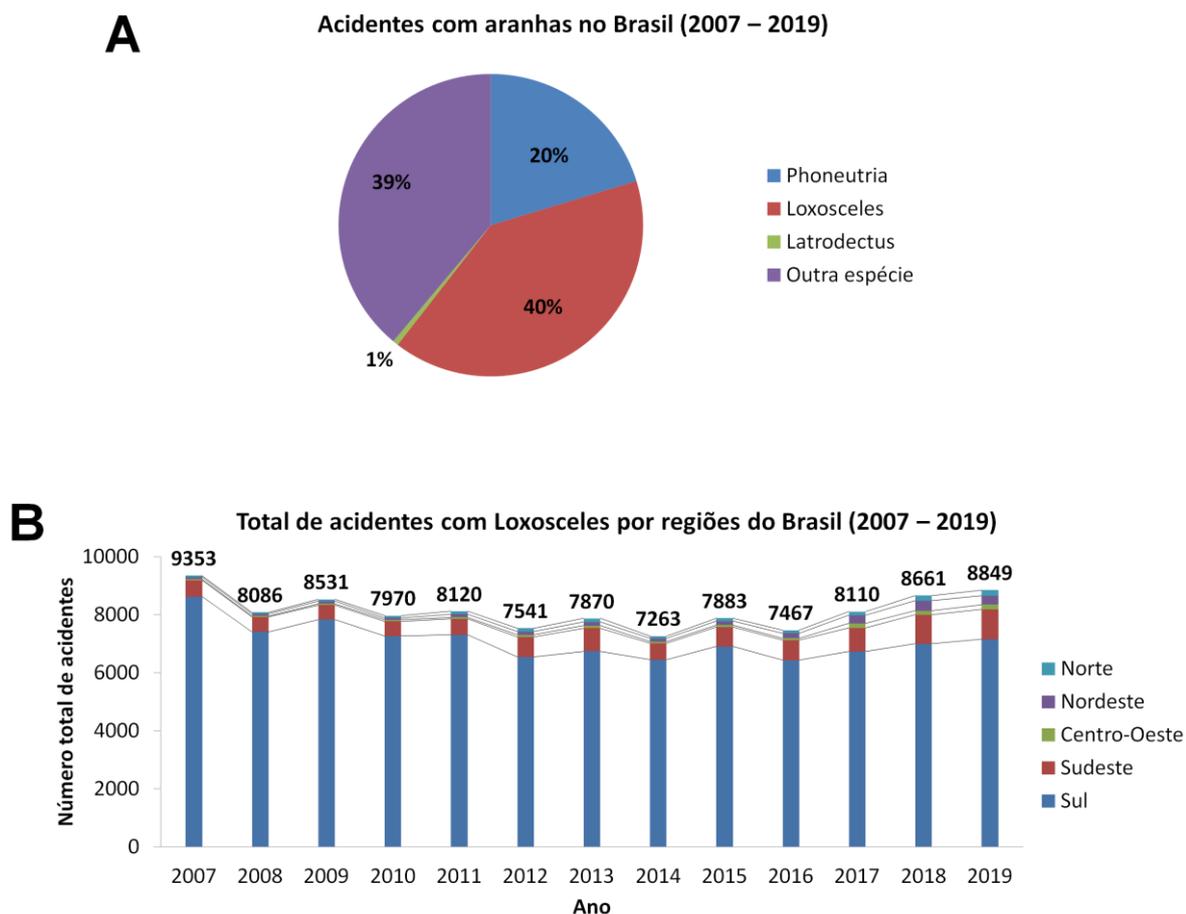


FIGURA 3 Epidemiologia dos acidentes com aranhas no Brasil entre os anos de 2007 a 2019. **A)** Porcentagem de acidentes com aranhas no Brasil. **B)** Número de acidentes com *Loxosceles* no Brasil (destacados em negrito) e acidentes por região brasileira. (Fonte: Ministério da Saúde, 2021).

A forma cutânea do loxoscelismo é observada em quase 80% dos casos de envenenamento e é caracterizada por lesão eritematosa e extensa dermonecrose (**FIGURAS 4 A-D**; Malaque et al., 2002; Vetter e Isbister, 2008; Lopes et al., 2020). Nas primeiras oito horas após o acidente observam-se no local da picada prurido, dor média a severa, bem como, sensação de queimação, eritema transiente e edema. Na forma cutânea do loxoscelismo também pode ocorrer a formação de uma placa contendo áreas isquêmicas, hemorragia e vasoconstrição, o que pode progredir para a formação de bolhas e uma extensiva área de necrose. A dermonecrose pode evoluir com ulceração e espalhamento gravitacional da lesão (Malaque et al., 2002; Vetter e Isbister, 2008; Lopes et al., 2020).

O loxoscelismo sistêmico é uma complicação menos comum, podendo ser observado em 10% a 26% dos quadros clínicos de loxoscelismo (**FIGURAS 4 E, F**; Malaque et al., 2011; Lopes et al., 2020). Além disso, alguns autores sugerem a existência de uma subnotificação de quadros mais leves de loxoscelismo sistêmico, o que promove um viés para que apenas sintomas mais graves e raros sejam notificados (Lopes et al., 2020). Os agravos do loxoscelismo sistêmico, como a falência renal aguda, podem levar a óbito, principalmente ao acometer idosos e crianças (Hogan et al., 2004). Os mecanismos de que levam aos quadros de falência renal ainda são pouco conhecidos, porém através de ensaios experimentais e biópsia renal foi evidenciado que a deposição de eosinófilos e pigmentos de conteúdo celular nos túbulos distais dos rins, bem como o edema e a hemorragia estão ligados a necrose renal (Lucato et al., 2011; Gonçalves, 2017). Além disso, sintomas não específicos podem ser associados aos efeitos sistêmicos, incluindo febre, calafrio, indisposição, náusea, prurido generalizado, erupções petequiais e vômito nas primeiras 24 e 48 horas. Outras alterações clínicas do loxocelismo incluem choque, icterícia, anemia hemolítica, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, bilirrubina elevada, hemoglobínúria, leucocitose, rabdomiolise e proteinúria (Malaque et al., 2002; Vetter e Ibister, 2008; Albuquerque et al., 2018; Lopes et al., 2020). Somado aos efeitos do veneno no organismo, foram relatados casos clínicos de infecção secundária por bactérias e fungos, fascite necrosante não infecciosa, síndrome compartimental e amputação de membro (Malaque et al., 2011; Tormos et al., 2019; Rodriguez-Roiz et al., 2017).

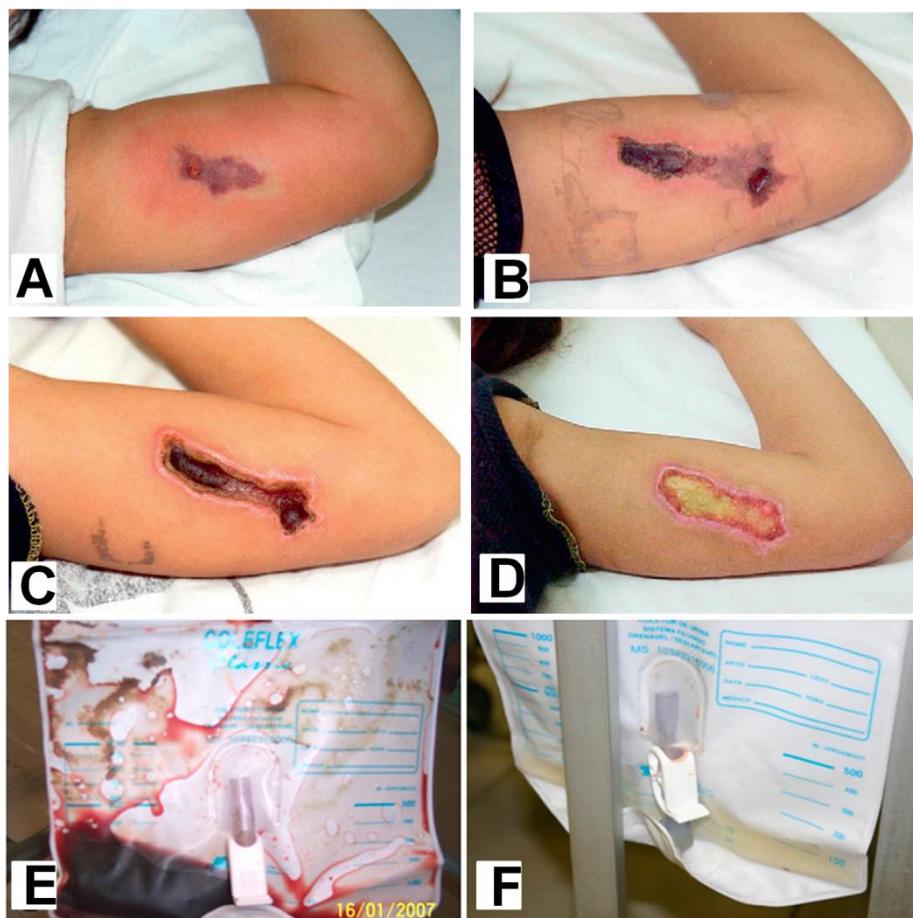


FIGURA 4 Progressão do Loxoscelismo cutâneo e sistêmico. **A)** Ulceração e necrose no dia 1, **B)** dia 9, **C)** dia 16, **D)** dia 25. (Fonte: adaptado de Ibister e Fan, 2011). **E)** Coleta de urina com hemoglobinúria e/ou hematúria devido à hemólise intravascular 30 horas após o acidente, **F)** urina normal 96 horas após o acidente. (Fonte: adaptado de Lopes et al., 2020)

1.2.1. Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo

O diagnóstico do loxoscelismo é atualmente baseado em observações clínicas, informações epidemiológicas da região e a identificação das aranhas (Andersen et al., 2011; Nentwig et al., 2017). Diferentes ensaios laboratoriais, como exames de dosagem de hemoglobina, bilirrubina e hemoglobinúria são utilizados como auxiliar no diagnóstico do loxoscelismo e como exames de monitoramento da evolução dos quadros clínicos (Lopes et al., 2020). Os acidentes são usualmente notados várias horas após a picada, principalmente quando o dano cutâneo é mais evidente e frequentemente o agente causador não é capturado, o que pode comprometer o diagnóstico (Malaque et al., 2002; Nentwig et al., 2017; Lopes et al.,

2020). Além disso, em países nos quais outras espécies de aranhas estão associadas à dermonecrose, pode ocorrer a ausência da correta identificação do agente causador, comprometendo o diagnóstico e promovendo uma superestimação dos casos de loxoscelismo (Vetter et al., 2003; Nentwing et al., 2017; Lopes et al., 2020). Por exemplo, aranhas do gênero *Sicarius*, que pertencem à mesma família das aranhas *Loxosceles*, também possuem veneno capaz de levar a dermonecrose e outros efeitos similares ao loxoscelismo (Van Aswegen et al., 1997; Avelar et al., 1992; Lopes et al., 2021a). Os sintomas do loxoscelismo também podem ser confundidos com outras patologias como dermatites, celulite infecciosa, úlcera diabética, infecção estafilocócica ou estreptocócica, herpes zoster e sepse (Vetter e Isbister, 2008; Swanson e Vetter, 2005; Nguyen e Pandey, 2019). Dessa forma, o reconhecimento tardio do loxoscelismo compromete a aplicação do tratamento adequado e possibilita o agravamento da sintomatologia (Malaque et al., 2002; Nentwig et al., 2017).

Em vista das limitações para o diagnóstico preciso do loxoscelismo, diferentes trabalhos tiveram como perspectiva o desenvolvimento e a padronização de ensaios laboratoriais que visam o diagnóstico dos casos de envenenamento com aranhas *Loxosceles*, incluindo diferentes ensaios imunoenzimáticos e métodos colorimétricos de imunodiagnóstico para detecção de antígenos relacionados ao veneno em amostras biológicas como soro, pelos e lesões na pele (Barrett et al., 1993; Chávez-Olórtegui et al., 1998; Krywko e Gomez, 2002; McGlasson et al., 2009; Jiacomini et al., 2016). Em trabalhos do nosso grupo de pesquisa também foram desenvolvidas alternativas mais eficientes para o diagnóstico do loxoscelismo a partir da funcionalização de anticorpos que reconhecem o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em amostras de urina (Biscoto, 2018). Entretanto, apesar do potencial para aplicação clínica, poucos casos clínicos reportados na literatura tiveram o diagnóstico confirmado por imunoenaios de ELISA (4,2%) e, até o momento, os métodos diagnósticos laboratoriais não possuem disponibilidade comercial (Lopes et al., 2020).

Existe uma multiplicidade de tratamentos sugeridos para o loxoscelismo, os quais são controversos e dependem da gravidade das lesões cutâneas e alterações sistêmicas. Diferentes terapias não específicas são utilizadas contra o loxoscelismo com sintomas leves ou moderados, incluindo anti-inflamatórios orais e tópicos, anti-

histamínicos e antibióticos. Em situações moderadas e graves de dermonecrose também há indicação de Dapsona, corticoides, colchicina e colágeno tópico (Paolino et al., 2020; Chaves-Moreira et al., 2017). Outras opções consideradas são intervenções cirúrgicas para a remoção da escara necrótica e reconstrução do tecido lesionado, bem como a transfusão de hemácias em caso de hemólise intravascular e hemodiálise em casos de falência renal (Ibister e Fan, 2011; Albuquerque et al., 2018). Para casos moderados e graves de loxoscelismo cutâneo e sistêmico, o Ministério da Saúde recomenda o uso dos antivenenos associados a corticosteroides (Ministério da Saúde, 2001).

Existem ainda outras formas de tratamentos utilizadas na clínica para a terapia do loxoscelismo, incluindo terapia com câmara hiperbárica de oxigênio a fim de diminuir as lesões necróticas e diminuir o crescimento de bactérias, como *Clostridium perfinges*, as quais são encontradas nas presas de *Loxosceles* (Hadanny et al., 2016; Swason e Veter, 2006; Monteiro et al., 2002; Cetinkaya et al., 2020). Outra alternativa é a terapia de troca plasmática (TPE) ou plasmaferese somada a transfusão sanguínea em casos de hemólise severa, objetivando a remoção de componentes plasmáticos como anticorpos, componentes do complemento e citocinas (Abraham et al., 2015; Cetinkaya et al., 2020). Outras terapias menos comuns são a terapia por pressão negativa (NPWT), utilizada para acelerar o processo de cicatrização com aumento do fluxo sanguíneo local e redução do edema, bem como o uso de fibroblastos autólogos no local da lesão para produção de colágeno e recuperação da área afetada (Miller et al., 2007; Guglielmetti et al., 2019). Além disso, uma pomada a base de tetraciclina foi recentemente desenvolvida pelo Instituto Butantan e CeTICS/FAPESP e está em fase de testes clínicos para o tratamento dos efeitos cutâneos do loxoscelismo (Lopes et al., 2020). A tetraciclina tem sido investigada como um antibiótico promissor para o tratamento dos efeitos dermonecroticos e efeitos de redução de danos renais causados pelo veneno de *Loxosceles*, uma vez que inibe a formação de metaloproteinases de matriz, reduzindo a expressão dessas proteínas que estão associadas com o desenvolvimento dos efeitos necróticos do veneno (Correa et al., 2016; Okamoto et al., 2017).

1.2.1.1. Terapia com antivenenos

Atualmente o único tratamento específico para o loxoscelismo é a terapia com antiveneno. No Brasil são produzidos e comercializados o soro anti-aracnídico e o soro anti-loxoscélico, ambos contendo fragmentos de imunoglobulina F(ab')₂ derivados de cavalo. O soro anti-aracnídico é produzido pelo Instituto Butantan em São Paulo a partir da imunização de equinos com venenos derivados das aranhas *L. gaucho* (Gertsch, 1967), *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e dos escorpiões *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello, 1922) e *Tityus bahiensis* (Perty, 1833). Já o soro anti-loxoscélico, produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do estado do Paraná (CPPI) é derivado da hiperimunização de cavalos com veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849), *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), e *L. gaucho* (Gertsch, 1967) (Pauli et al., 2006).

A terapia com antivenenos é amplamente utilizada e busca a redução da lesão e a possível prevenção de manifestações sistêmicas, porém existem limitações tanto na produção como na utilização do soro (Miranda et al., 2021). Para a hiperimunização de equinos e produção dos anticorpos são necessárias grandes quantidades de veneno e a extração de veneno de *Loxosceles* por eletroestimulação ou por suave compressão do cefalotórax resulta em poucos microlitros e microgramas de proteínas do veneno (Chaves-Moreira et al., 2019). A manutenção em cativeiro de aranhas *Loxosceles* ainda é um grande desafio e várias aranhas morrem após o processo de eletroestimulação ou precisam ser sacrificadas para remoção das glândulas a fim de se obter maiores quantidades de veneno (Gremiski et al., 2014; Miranda et al., 2021). Os animais utilizados durante os protocolos de imunização e nos testes de neutralização com os anticorpos produzidos também sofrem os efeitos deletérios promovidos pelos componentes tóxicos do veneno (Theakston et al., 2003; Pauli et al., 2006; Felicori et al., 2009). A distribuição dos soros também enfrenta desafios, uma vez que por serem comercializados em estado líquido, os antivenenos precisam ser transportados em temperaturas ótimas entre 3°C a 5°C, o que torna o processo mais laborioso para regiões de clima tropical (Miranda et al., 2021).

Além disso, erros no diagnóstico do loxoscelismo, bem como a procura tardia para o tratamento limitam a efetividade do soro, uma vez que o mesmo é pouco efetivo na neutralização das lesões necróticas quando aplicado 72 horas após o acidente (Ibister e Fan, 2011; Pauli et al., 2009). Ainda, os antivenenos podem gerar reações adversas, incluído reações alergias, anafiláticas e outros sintomas (Miranda et al., 2021). Em estudo recente, Grashof e colaboradores (2020) também mostraram que um anti-aracnídico produzido no México (AAA2013-BB-IND 15757) não foi capaz de inibir a atividade anticoagulante do veneno de *L. reclusa* (Gertsch & Mulaik, 1940). Assim, torna-se imprescindível a otimização dos protocolos de produção de antivenenos e de controle de qualidade que possam garantir a eficácia e a segurança do produto (Miranda et al., 2020). Além disso, é indispensável que novas técnicas para a produção de antivenenos sejam estudadas, como por exemplo, o uso de proteínas recombinantes, epítopos sintéticos e inovações em protocolos de imunização que visam contribuir para a otimização dos antivenenos e para o bem estar animal (Olvera et al., 2006; Figueiredo et al., 2014; Miranda et al., 2021).

1.3. Veneno de *Loxosceles*

As aranhas *Loxosceles* produzem seu veneno em um par de glândulas situadas no cefalotórax. O veneno é constituído por uma mistura de proteínas, glicoproteínas e peptídeos de baixo peso molecular (Malaque et al., 2017). Uma *Loxosceles* adulta é capaz de injetar poucos microlitros de veneno (4 ul) contendo uma quantidade de 30 a 100 µg de proteínas (Gremski et al., 2014). As aranhas *Loxosceles* fêmeas produzem maiores quantidades de veneno do que os machos da mesma espécie, o que pode estar correlacionado ao maior tamanho e peso das fêmeas (Malaque et al., 2017). Análises dos perfis eletroforéticos das peçonhas de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), *L. laeta* (Nicolet, 1849), *L. reclusa* (Gertsch & Mulaik, 1940) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) mostraram um padrão de similaridade entre os componentes proteicos e uma predominância de proteínas em regiões de 5 a 40 kDa (Barbaro et al., 2005; Silvestre et al., 2005). Análises de transcritos por EST das glândulas de veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. intermedia* (Mello-

Leitão, 1934) mostraram que 39 e 43,5% dos transcritos são toxinas, dentre as quais a maior parte corresponde a fosfolipases D, proteases do tipo astacina e peptídeos ICK (*Inhibitor Cystine Knot*) de baixo peso molecular (Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Gremski et al., 2010).

Os efeitos observados no loxoscelismo são decorrentes do sinergismo entre os diversos componentes do veneno (Kalapothakis et al., 2007). Diferentes estudos buscaram analisar os efeitos *in vivo* do veneno de *Loxosceles*, sendo que o coelho é o melhor modelo animal para verificar os efeitos cutâneos do veneno, uma vez que esse animal, ao contrário dos camundongos, desenvolve um padrão de resposta e espalhamento gravitacional da lesão similar ao observado em humanos (Futrel, 1992; Pereira et al., 2012a,b). Análises histopatológicas após injeções em peles de coelhos mostraram que o veneno promove infiltrado massivo de leucócitos, com predominância de células polimorfonucleares, edema, vasodilatação, hemorragia, dissociação da derme-epiderme, necrose nas camadas da derme e coágulos (Ospedal et al., 2002; Pereira et al., 2012a; Oliveira-Mendes et al., 2020). O infiltrado exacerbado de leucócitos polimorfonucleares é considerado o maior responsável pelos danos ao tecido e a indução de neutropenia em coelhos inibiu o desenvolvimento das lesões necróticas, vasodilatação e hemorragia promovidas pelo veneno, embora a depleção do influxo de neutrófilos não tenha impedido a hemorragia e a degradação de colágeno (Sunderkotter et al., 2001; Tambourgi et al., 2005). A ativação de leucócitos foi correlacionada à atividade do veneno em células endoteliais e experimentos *in vivo* mostraram a adesão de leucócitos ao endotélio, a transmigração de leucócitos através da membrana endotelial e a degeneração de vasos sanguíneos (Patel et al., 1994; Paludo et al., 2006; Veiga et al., 2001).

Análises *in vitro* também contribuíram para elucidar os efeitos citotóxicos do veneno de *Loxosceles*. A atividade do veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) em células endoteliais mostrou mudanças na adesão celular seguida pela retração e destacamento celular levando a apoptose, sendo que não foram observados danos aos lisossomos. Tais efeitos foram correlacionados com a fragilidade vascular e os efeitos hemorrágicos do veneno (Nowatzki et al., 2010; 2012). Em queratinócitos humanos tratado com veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849) ocorreu o aumento da expressão de metaloproteases (MMP2, MMP7 e MMP9), além de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio, fatores associados a apoptose e dano ao DNA

(Paixão-Cavalcante et al., 2006; da Silva et al., 2020). O veneno de também promove efeitos citotóxicos em fibroblastos, eritrócitos e células renais (Dantas et al., 2014; Chaves-Moreira et al., 2011; Chaim et al., 2006; Kusma et al., 2008). Além disso, o veneno de *L. gaucho* (Gertsch, 1967) promove adesão e agregação plaquetária, bem como induz a ativação de plaquetas humanas e de coelhos aumentando a expressão de LIBSI (*ligand-induced binding site I*) e de P-selectina (Tavares et al., 2011).

Outros experimentos mostraram efeitos sistêmicos, como danos renais agudos promovidos pelo veneno de *L. gaucho* (Gertsch, 1967), os quais foram independentes dos efeitos cutâneos e estão relacionados ao bloqueio do fluxo renal e a rabdomiolise sistêmica (Lucato et al., 2011). Efeitos cardiotoxicos também foram relatados para o veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) injetado em camundongos (Dias-Lopes et al., 2010a). Além disso, o veneno de *Loxosceles appachea* promoveu alterações em regiões do sistema nervoso central de ratos. Os autores verificaram hemorragia em duas estruturas cerebrais, a área postrema e o plexus coroide, ligadas a degradação da laminina γ , bem como observaram que o veneno de *L. appachea* (Gertsch & Ennik, 1983) induziu leucopenia, neutrofilia e acantocitose em sangue periférico (Plenge-Tellechea et al., 2019).

Os efeitos tóxicos do veneno podem variar de acordo com a espécie de *Loxosceles*. Estudos comparativos do veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) mostraram que o veneno da primeira espécie causa lesões maiores *in vivo* e possui maior atividade hemolítica (de Oliveira et al., 2005; de Oliveira-Lima et al., 2016). Os venenos de *Loxosceles boneti* (Gertsch, 1958), *L. reclusa* (Gertsch & Mulaik, 1940) e *L. laeta* (Nicolet, 1849) mostraram diferenças quanto ao potencial de clivar a cadeia A α do fibrinogênio. Além disso, apenas o veneno de *L. reclusa* (Gertsch & Mulaik, 1940) apresentou atividade anticoagulante (Grashof et al., 2020). Análises das atividades tóxicas dos venenos de *Loxosceles amazonica* (Gertsch, 1967) e *Loxosceles willianilsoni* (Fukushima, de Andrade & Bertani, 2017) também revelaram que os venenos dessas espécies possuem atividade esfingomielinásica e induzem hemólise dependente do sistema complemento, porém não exibem atividade citotóxica em queratinócitos, que foi observada para o veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849). Os autores sugerem que variações interespecíficas poderiam estar relacionadas a uma menor toxicidade do

veneno de ambas as espécies em comparação ao veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849) (Lopes et al., 2021b).

Estudos das atividades isoladas de toxinas também têm contribuído para elucidar os mecanismos de ação dos diferentes componentes do veneno, como as fosfolipases D que são capazes de interagir com a matriz extracelular, desregular o sistema complemento e promover *in vivo* os efeitos observados durante o loxoscelismo, incluindo dermonecrose, agregação plaquetária e hemólise (Chaves-Moreira et al., 2017; Oliveira-Mendes et al., 2020). Outras enzimas presentes no veneno são as metaloproteases e as serinoproteases que apresentam atividade gelatinolítica, degradando fibrina e fibrinogênio, e assim comprometem a estrutura da membrana basal (Veiga et al., 2000; Trevisan-Silva et al., 2013; Medina-Santos et al., 2019). As hialuronidases presentes no veneno de *Loxosceles* foram associadas ao efeito de espalhamento gravitacional da lesão necrótica, além de potencializar os efeitos danosos promovidos pelas fosfolipases D (Ferrer et al., 2013; De Bona et al., 2021). Outros componentes não enzimáticos do veneno de *Loxosceles* são os peptídeos ICK que atuam em canais voltagem-dependente para sódio (NaV) e cálcio (CaV) e possuem atividade inseticida (de Castro et al., 2004; Matsubara et al., 2013). Uma proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) presente no veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) foi isoladamente caracterizada e promoveu edema, atividade inflamatória e a permeabilidade vascular (Sade et al., 2012). Através de análises transcriptômicas tem sido demonstrada a presença de sequências com alta similaridade a toxinas alergênicas - LALLT (*Loxosceles Allergen-Like Toxin*), as quais são ricas em cisteínas e podem estar relacionadas aos eventos de hipersensibilidade descritos após o envenenamento (Gremski et al., 2014; Justa et al., 2020). Além dos componentes tóxicos do veneno, foi identificado no veneno de *L. gaucho* (Gertsch, 1967) um peptídeo antimicrobiano com atividade em bactérias gram-negativa (Segura-Ramirez et al., 2018).

1.3.1. Veneno de *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898)

Nosso grupo também tem trabalhado na caracterização transcriptômica por NGS da glândula de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) e até o momento foram encontradas diversas toxinas como fosfolipases D (incluindo 23 sequências de proteínas Loxtox), toxinas inseticidas, metaloproteases, TCTP, toxinas alergênicas, serinoproteases, hialuronidases e outras toxinas, as quais correspondem a 9,6% dos transcritos totais (Dantas et al., 2016; da Silva, 2018). Diferentes trabalhos demonstraram as primeiras caracterizações bioquímicas e moleculares do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), bem como a identificação dos principais efeitos do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) no loxoscelismo (Oliveira-Mendes et al., 2020; Silvestre et al., 2005; Chatzaki et al., 2012; Horta et al., 2013; Dantas, et al., 2014, 2016). A avaliação da ação dermonecrótica ocasionada por *L. similis* (Moenkhaus, 1898) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) mostrou que aranhas fêmeas promovem uma lesão mais exacerbada quando comparada as lesões provocadas por machos (de Oliveira et al., 1999; Chatzaki et al., 2012). Foi mostrado também que em camundongos o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) possui uma dose letal DL_{50} de 0,32 mg/Kg (Silvestre et al., 2005), enquanto as doses letais calculadas para os venenos de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e *L. laeta* (Nicolet, 1849) são respectivamente 0,48 mg/Kg , 0,74 mg/Kg e 1,45 mg/Kg (Mota e Barbaro, 1995).

Experimentos *in vivo* mostram que o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) causa necrose, hiperemia, trombose, denso infiltrado inflamatório e a dissociação de fibras colágenas e reticulares na derme (Chatzaki et al., 2012; Pereira et al., 2012a,b, 2014). Sabe-se que vários mediadores biológicos e vias celulares são liberados e ativados pelos componentes do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). Em fibroblastos humanos, o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) estimulou a liberação de mediadores da ativação da resposta inflamatória IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2 através de vias receptoras de ácido lisofosfatídico (LPA), bem como promoveu a ativação das caspases-3, 6, 7 e 9 da via de apoptose (Horta et al., 2013; Dantas et al., 2016). Além disso, injeções de 1,4 mg/Kg de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) foi capaz de promover alterações renais como formação de vacúolos nas células do epitélio tubular, necrose tubular, deposição de detritos

celulares no lúmen do túbulo e hemorragia na região glomerular (Gonçalves, 2017). Ainda, o antiveneno produzido a partir de protocolos de imunização com veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em coelhos foi capaz de neutralizar os principais efeitos necróticos cutâneos e renais do veneno, diminuindo o tamanho das lesões em pele de coelho e minimizando as alterações histopatológicas renais e dérmicas (Chatzaki et al., 2012; Gonçalves, 2017).

1.4. Fosfolipases D de *Loxosceles*

As enzimas fosfolipases D (PLD) do veneno de *Loxosceles* pertencem à família de domínios proteicos conhecidos como enzimas PLD do tipo Glicerofosfodiester Fosfodiesterase (GDPD) (Binford et al., 2009). Os genes codificadores para enzimas PLD tipo GDPD foram descritos em diferentes organismos como bactérias, fungos, artrópodes e cnidários (Dias-Lopes et al., 2013; Lajoie et al., 2015a; Cordes e Binford, 2018). Diferentes autores discutem uma possível origem comum para as toxinas do grupo GDPD presentes nesses organismos, com múltiplos eventos de duplicação e perda de genes, bem como a contribuição da transferência horizontal de genes entre esses organismos (Fry et al., 2009; Dias-Lopes et al., 2013; Cordes e Binford, 2018). Em *Loxosceles* foi proposto o nome *Loxtox* (*Loxosceles toxin*) para o conjunto de genes homólogos que codificam as fosfolipases D que apresentam ação ligada ao loxoscelismo (Kalapothakis et al., 2007). Além disso, também foi sugerido o nome *SicTox* (*Sicariidae toxin*) como uma designação ampla, uma vez que os genes codificantes são encontrados em múltiplas cópias tanto em *Loxosceles* como em *Sicarius* (Binford et al., 2009). As múltiplas cópias de genes para fosfolipase D encontradas no veneno de diferentes organismos remetem ao papel biológico dessas enzimas no mecanismo de predação e defesa das aranhas, o qual ainda é pouco explorado (Binford et al., 2009; Zobbel-Throop et al., 2012).

As fosfolipases D têm sido caracterizadas principalmente pela capacidade de provocarem os principais efeitos do loxoscelismo. Elas representam aproximadamente 15%, 20% e 16% das toxinas presentes nos venenos de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) e *L. laeta* (Nicolet, 1849),

respectivamente (Dantas et al., 2016; Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Gremski et al., 2010). Ainda, um peptídeo com potencial antimicrobiano encontrado no veneno de *L. gaucho* (Gertsch, 1967) apresentou uma sequência de aminoácidos idêntica a fosfolipases D e os autores hipotetizaram que o peptídeo possa ter sido originado por proteólise dessas toxinas (Segura-Ramirez et al., 2018). As fosfolipases D presentes no veneno de diferentes *Loxosceles* possuem massa molecular variando de 31 a 35 kDa e as sequências das isoformas compostas por 284 ou 285 resíduos de aminoácidos apresentam regiões conservadas (Binford e Wells, 2003; Kalapothakis et al., 2007). Diferentes efeitos foram observados para fosfolipases D, como hemólise, agregação plaquetária com liberação de fosfatidilserina, dermonecrose, edema, ativação do complemento, imunogenicidade, permeabilidade vascular, efeitos cardiotoxicos, aumento da expressão de metaloproteases (MMP2, MMP9 e MMP7) em queratinócitos e estímulo de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (da Silva et al., 2004; Dias-Lopes et al., 2010a; Chaim et al., 2011; Horta et al., 2013; Corrêa et al., 2016; Fukuda et al., 2017; Oliveira-Mendes et al., 2020). A hemólise promovida pelo veneno loxoscélico também está relacionada aos efeitos da fosfolipases D diretamente sobre os lipídeos da membrana celular, como esfingomiéline e lisofosfatidilcolina, bem como a ativação indireta do sistema complemento o que leva a ativação de metaloproteases (Chaves-Moreira et al., 2009, 2011, 2017). Além disso, recentemente foi evidenciado que uma fosfolipase D recombinante de *L. laeta* (Nicolet, 1849), bem como o veneno da mesma espécie, foram capazes de aumentar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio após ligação na superfície celular, o que promoveu danos ao DNA dos queratinócitos tratados, bem como foi identificada a presença de histonas γ H2AX, sugerindo a ativação do mecanismo de reparo de DNA (da Silva et al. 2020).

Existem variações inter e intraespecíficas entre as fosfolipases D do gênero *Loxosceles* e do gênero *Sicarius*. Por exemplo, fosfolipases D encontradas em *Sicarius tropicus* possuem atividade esfingomiélinásica, porém apresentam um diferente mecanismo para hemólise, o qual ainda não foi esclarecido (Lopes et al., 2021a). Os efeitos tóxicos das fosfolipases D também variam entre as isoformas presentes no veneno de *Loxosceles* da mesma espécie. Isoformas de fosfolipase D isoladas do veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) mostraram diferenças na atividade histopatológica, hemolítica e enzimática (da Silveira et al., 2006, 2007;

Chaves-Moreira et al., 2011; Oliveira-Mendes et al., 2020). Além disso, fosfolipases D purificadas do veneno de *L. boneti* (Gertsch, 1958) não apresentaram atividade necrótica e enzimática (Ramos-Cerrilo et al., 2004). Dessa forma, a caracterização dos efeitos isolados dessas toxinas contribui para elucidar os mecanismos de ação do veneno na patofisiologia do loxoscelismo e compreender diferenças nos sintomas observados após o envenenamento.

Nos últimos anos por meio de técnicas de biologia molecular, proteômica e transcriptômica diferentes isoformas de fosfolipases D foram encontradas e caracterizadas (Chaves-Moreira et al., 2017; Oliveira-Mendes et al., 2020). Utilizando a técnica de RNA-seq, foi realizado o transcriptoma da glândula de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (Dantas et al., 2016). Foram identificadas 23 isoformas completas de fosfolipase D nomeadas como Loxtox e classificadas em 12 subgrupos (**FIGURA 5**). Entre as isoformas encontradas, as Loxtox dos subgrupos s1 e s11 representam mais de 70% das fosfolipases D presentes no veneno e possuem alta similaridade com fosfolipases D de outras espécies de *Loxosceles* (**FIGURA 5**; Dantas et al., 2016). As Loxtox do grupo s1 foram agrupadas por similaridade a outras toxinas presente no veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) e *L. gaucho* (Gertsch, 1967) que apresentam atividade esfingomielinásica e alta toxicidade em testes *in vivo* (Vuitka et al., 2016; Magalhães et al., 2013). Por outro lado, as sequências das Loxtox do subgrupo s11 foram classificadas junto a toxinas de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) que não promovem dermonecrose e apresentam baixa atividade de esfingomielinase. Além disso, foram identificadas 3 sequências incompletas de fosfolipases D, das quais duas foram comparadas por identidade a fosfolipase D de uma aranha *Stegodyhus mimosarum* e uma teve maior porcentagem de identidade com uma fosfolipase D da bactéria *Simkania negevensis* (Dantas et al., 2016). Neste trabalho foram caracterizadas a ação isolada da forma recombinante de duas Loxtox (s1A e s11A) presentes no veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898).

Grupo das Loxtox	PLDs dos bancos de dados	Atividade Farmacológica	% expressão
<u>Loxtox s1A</u>	Loxtox i1, i2, i3, i4 <i>L. intermedia</i> Phospholipase D LgSicTox-alphaA1 <i>L. gaucho</i> Phospholipase D LiSicTox-alphaA1a <i>L. intermedia</i>	Atividade esfingomielinásica. Pode agir em outros ésteres fosfatídicos. Pode induzir hemólise via complemento ou direta, além de dermonecrose, aumento da permeabilidade vascular e agregação plaquetária.	s1 53,9%
Loxtox s1B			
Loxtox s1D			
Loxtox s1C			
Loxtox s2A	Não determinada	Não determinada	s2 6,2%
Loxtox s2B			
Loxtox s2C			
Loxtox s3A	Loxtox i5 <i>L. intermedia</i>	Semelhante ao grupo 1	s3 8,6%
Loxtox s4B	Phospholipase D LiRecDT7 <i>L. intermedia</i>	Semelhante ao grupo 1	s4 1%
Loxtox s5A	Phospholipase D isoform 1 <i>L. reclusa</i>	Atividade hemolítica	s5 0,01%
Loxtox s6A	Não determinada	Não determinada	s6 0,03%
Loxtox s7A	Não determinada	Não determinada	s7 0,12%
Loxtox s8B	Phospholipase D SdSicTox-betaIIb1bvi <i>Sicarius damarensis</i>	Não determinada	s8 0,73%
Loxtox s8C			
Loxtox s8A			
Loxtox s9A	Não determinada	Não determinada	s9 8,3%
Loxtox s10A	Phospholipase D LiSicTox-betaID1 <i>L. intermedia</i>	Baixa atividade esfingomielinásica. Pode agir em outros ésteres fosfatídicos. Causa dermonecrose, induz resposta inflamatória, agregação plaquetária e permeabilidade vascular. POde induzir hemólise via complemento ou direta.	s10 2,6%
Loxtox s10B			
<u>Loxtox s11A</u>	Loxtox i6 <i>L. intermedia</i> Loxtox i7 <i>L. intermedia</i>	Baixa atividade esfingomielinásica. Pode agir em outros ésteres fosfatídicos. Não causa hemólise, dermonecrose, permeabilidade vascular. Causa inchaço e eritema. Baixa atividade esfingomielinásica. Pode agir em outros ésteres fosfatídicos. Não causa hemólise, dermonecrose, permeabilidade vascular ou agregação plaquetária. (Por similaridade).	s11 18,5%
Loxtox s11B			
Loxtox s11C			
Loxtox s11D			
Loxtox s12A	Sphingomyelin phosphodiesterase D LrSicTox-alphaIb1 ^{KFM76547} <i>Sicarius mimosarum</i>	Não determinada	s12 0,002%

FIGURA 5 Árvore com os 12 subgrupos de Loxtox encontradas no transcriptoma da glândula de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). São mostrados os nomes das 23 sequências, a similaridade com outras fosfolipases D e as principais características que foram correlacionadas com cada isoforma de Loxtox. As Loxtox produzidas neste trabalho foram destacadas em vermelho (Fonte: Adaptado de Dantas et al., 2016).

1.4.1. Atividade bioquímica e estrutura das Fosfolipases D de *Loxosceles*

Devido à atividade enzimática contra esfingomielina, as fosfolipases D também são conhecidas como esfingomielinases D (SMase D). Porém, o nome fosfolipase D foi sugerido uma vez que essas enzimas têm como substrato muitos outros fosfolipídios (Meeteren et al., 2004; Lee e Lynch, 2005; Lajoie et al., 2015a,b). Diferentes trabalhos indicam a atividade hidrolítica das fosfolipases D contra esfingomielina e lisofosfatidilcolina liberando colina e ceramida-1-fosfato (CIP) ou LPA (Meeteren et al., 2004; Lee e Lynch, 2005; Horta et al., 2013). Outros autores mostraram que as fosfolipases D de *Loxosceles* e *Sicarius* realizam a transfosfatidilação de esfingomielina e lisofosfatidilcolina gerando moléculas de fosfato de ceramida cíclica (CC (1,3) P) e ácido fosfatídico cíclico (cPA), respectivamente (Lajoie et al., 2013; Lajoie et al., 2015a,b).

Estudos de cristalografia de raio-X mostraram que as fosfolipases D possuem uma estrutura principal composta por 8 folhas β dispostas paralelamente, interligadas por 8 *loops* flexíveis em α hélice formando a estrutura $(\alpha/\beta)_8$ denominada TIM-barril (**FIGURA 6**; Murakami et al., 2005, 2006). No sítio catalítico encontra-se uma região de *loops* hidrofóbicos e resíduos de amino ácidos negativamente carregados (Murakami et al., 2005, 2006). No *loop* catalítico dispõem-se dois resíduos de histidina (H¹² e H⁴⁷ na fosfolipase D recombinante Smase I de *L. laeta* (Nicolet, 1849)) que atuam na catálise dos fosfolipídeos juntamente com outros amino ácidos (Ácido Glutâmico (E³²), Ácido Aspartico (D³⁴, D⁵², D⁹¹, D²³³), Lisina (K⁹³) Triptofano (W²³⁰), e Asparagina (N²⁵²) na Smase I de *L. laeta* (Nicolet, 1849)) que se ligam ao íon Mg²⁺, um co-fator que auxilia no reconhecimento e na estabilização da proteína durante a ligação ao substrato (Murakami et al., 2006). Os resíduos presentes no sítio catalítico dessas enzimas são conservados entre fosfolipases D

de várias espécies de *Loxosceles*, entretanto, ensaios de mutação sítio dirigida mostraram que alterações em outros resíduos, incluindo Tirosinas (Y²²⁸, Y²²⁹) envolvidas indiretamente com o mecanismo catalítico das enzimas, modificam a capacidade das fosfolipases D de provocarem efeitos biológicos e alteram a especificidade frente a diferentes substratos (**FIGURA 6 A**; Vuitila et al., 2016, Lajoie et al., 2015 b; da Silva et al., 2021).

As fosfolipases D também possuem pontes dissulfeto que interligam o *loop* catalítico ao *loop* flexível, e a presença de uma ou duas pontes dissulfeto associada a extensão do *loop* hidrofóbico forneceram os parâmetros para Murakami e colaboradores (2006) classificá-las em duas classes (I e II): as enzimas classificadas como classe I foram encontradas no veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849) e possuem uma ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (C⁵¹ e C⁵⁷; **FIGURAS 6 B, C**), bem como um *loop* flexível mais extenso (**FIGURA 6 B**); já as fosfolipases D de classe II apresentam uma ponte dissulfeto adicional entre outros resíduos de cisteína (C⁵³ e C²⁰¹; **FIGURAS 6 B, C**). Originalmente as fosfolipases D de classe II foram subdivididas em dois grupos (a e b): as enzimas de classe IIa usam a esfingomielina como substrato e apresentam maior toxicidade biológica, como mostrado por isoformas presentes no veneno de *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (da Silveira et al., 2007; Magalhães et al., 2013; Vuitika et al., 2016; Oliveira-Mendes et al., 2020); já as enzimas de classe IIb, representadas por algumas fosfolipases D encontradas no veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) e *L. boneti* (Gertsch, 1958), apresentam reduzida atividade biológica e nenhuma atividade catalítica contra esfingomielina (Ramos-Cerrilo et al., 2004; Murakami et al., 2006; da Silveira et al., 2006, 2007; Oliveira-Mendes et al., 2020). Entretanto, Lajoie e colaboradores (2015a,b) demonstraram que duas fosfolipases D originadas do veneno de *Loxosceles arizonica* (Gertsch & Mulaik, 1940) e de *Sicarius terrosus* (Nicolet, 1849) e previamente classificadas como classe IIb, foram capazes de atuar sobre fosfolípidos carregados positivamente, como esfingomielina e fosfatidiletanolamina. Dessa forma, o estudo isolado de diferentes isoformas de fosfolipases D contribui para investigar o mecanismo de ação sobre diferentes fosfolípidos presentes na membrana celular e elucidar as diferenças de toxicidade observadas entre as toxinas.

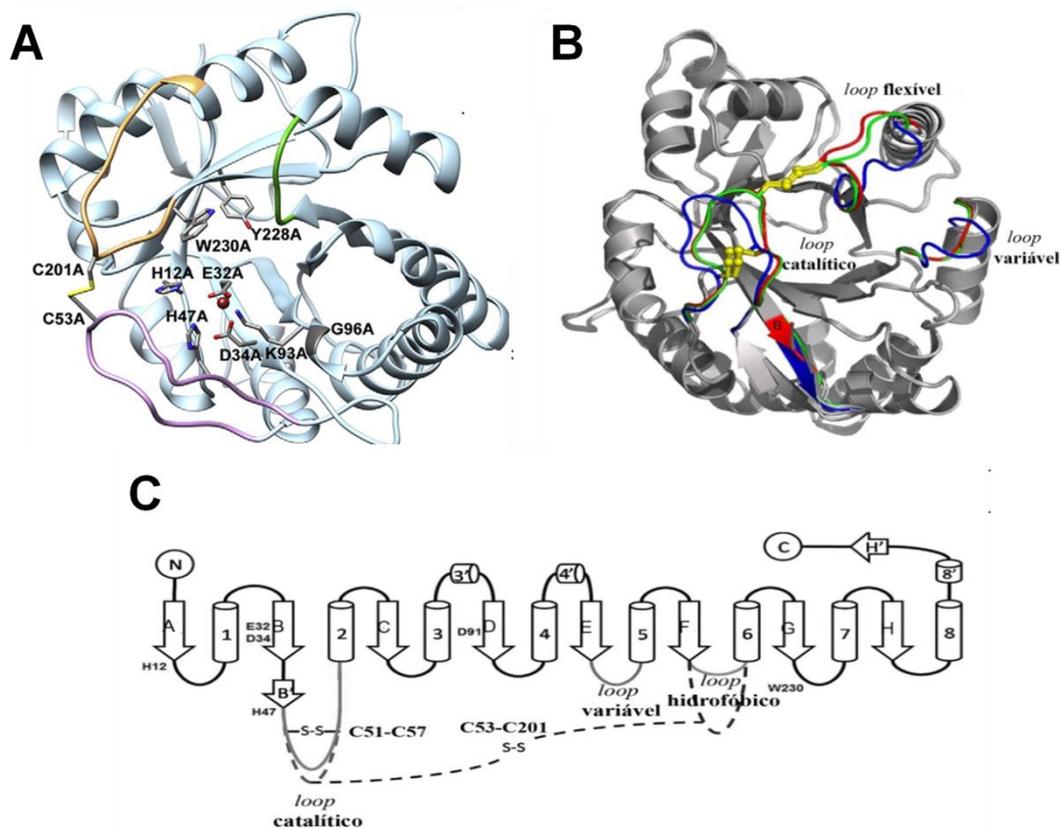


FIGURA 6 Resíduos do sítio catalítico e diferenças na topologia e estrutura das fosfolipases D de classe I e classe II. **A)** Estrutura tridimensional (3D) representativa das fosfolipases D com destaque para os resíduos do sítio catalítico (H^{12} , H^{47} , E^{32} , D^{34} , C^{53} , C^{201} , K^{93} , Y^{228} e W^{230}) e íon magnésio representado por uma esfera vermelha. **B)** Diferença da estrutura 3D das fosfolipases D de classe I e classe II. Os loops das fosfolipases D de classe I estão representados em azul, os loops correspondentes as fosfolipases D de classe IIa e classe IIb estão mostrados em vermelho e verde, respectivamente. As ligações de pontes dissulfeto estão evidenciadas em amarelo. **C)** Topologia da fosfolipase D de classe I de *L. laeta* (Nicolet, 1849) e classe II de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934). As folhas β e as α hélice são respectivamente mostradas como setas (A-H) e cilindros (1-8) que formam a estrutura principal em forma de barril $(\alpha/\beta)_8$. Estão em evidência as pontes dissulfeto entre as cisteínas C^{51} - C^{57} (fosfolipases D classe I e classe II) e entre as cisteínas C^{53} - C^{201} (fosfolipases D classe II), os loops catalítico, variável e hidrofóbico. As letras N e C representam respectivamente as regiões amino e carboxi terminais das fosfolipases D, respectivamente. (Fonte: Adaptado de Murakami et al., 2006; Gremski et al., 2014; Vuitika et al., 2016).

1.4.2. Aplicações no diagnóstico e na terapia do loxoscelismo

Nos últimos anos, muitos trabalhos tem evidenciado a busca pelo aprimoramento da produção de anticorpos que reconheçam os componentes tóxicos do veneno. Além disso, tecnologias de biologia molecular facilitaram a produção de proteínas e epítomos recombinantes possibilitando a obtenção de grandes quantidades de antígenos para a produção de anticorpos (Miranda et al., 2021). Assim, por estarem presentes em grandes quantidades no veneno de *Loxosceles* e serem uma das proteínas que gera os principais efeitos do loxoscelismo, as fosfolipases D são um dos principais alvos no desenvolvimento de métodos diagnósticos e na terapia com antivenenos (Miranda et al., 2021).

O diagnóstico impreciso e muitas vezes tardio do loxoscelismo compromete o tratamento adequado, assim as fosfolipases D foram consideradas como agentes para o desenvolvimento de imunodiagnóstico do loxoscelismo. Foram desenvolvidos anticorpos monoclonais modificados em uma proteína colorimétrica bifuncional consistindo em uma cadeia única de anticorpo IgG associado a enzima fosfatase alcalina. Em diferentes imunoenaios os anticorpos foram capazes de detectar fosfolipases D do veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) em limites de até 39 ng/mL sem reatividade cruzada (Jiacomini et al., 2016).

O uso de fosfolipases D recombinantes nos protocolos de imunização visa substituir totalmente ou parcialmente o veneno de *Loxosceles* (Kalapothakis et al., 2002; Olvera et al., 2006; Figueiredo et al., 2014). Além disso, outras metodologias como *phage display* e a técnica de imunoenasão de Spot são empregadas para a busca de anticorpos e epítomos que se ligam as sequências antigênicas específicas das fosfolipases D (Dias-Lopes et al., 2010b; de Moura et al., 2011). A identificação de regiões imunogênicas das fosfolipases D através de imunoenaios de Spot tornou possível a produção de proteínas quiméricas que não apresentam toxicidade e ao mesmo tempo são capazes de induzir a produção de anticorpos que neutralizam os efeitos deletérios do veneno (Felicori et al., 2009; de Moura et al., 2011; Lima et al., 2018).

Calabria e colaboradores (2019) mostraram que anticorpos gerados a partir da imunização com uma proteína quimérica contendo epítomos referentes a uma fosfolipase D e uma metaloprotease de *L. gaucho* (Gertsch, 1967) foi capaz de neutralizar os efeitos dermonecróticos, fibrinogenolíticos e de agregação plaquetária

dos venenos de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e *L. laeta* (Nicolet, 1849). Além disso, a identificação de epítomos específicos na sequência das fosfolipases D mostrou correlação com o potencial de neutralização dos antivenenos produzidos, evidenciando a potencial aplicação dessas enzimas para o desenvolvimento de métodos alternativos ao ensaio de neutralização tradicional (Ramada et al., 2013). Costa e colaboradores (2020) utilizaram uma proteína quimérica contendo epítomos com sequências não tóxicas de fosfolipase D, metaloprotease e hialuronidase do veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) na produção de anticorpos monoclonais (mAbs), os quais apresentaram reatividade cruzada no reconhecimento do veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849) peruana e *L. gaucho* (Gertsch, 1967). Além disso, em teste *in vitro* os anticorpos monoclonais foram capazes de neutralizar a atividade fibrinogenolítica causada por metaloproteases de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (Costa et al., 2020).

As fosfolipases D também podem ser empregadas no desenvolvimento de vacinas que protejam contra os principais efeitos do loxoscelismo (Chaim et al., 2011). Uma proteína quimérica (rMEPLox) não tóxica foi desenvolvida a partir da adição de sequências de metaloproteases e hialuronidases de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) a uma outra proteína quimérica (rCpLi) que possui sequências de epítomos específicos para LiD1, uma fosfolipase D recombinante de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (Lima et al., 2018). Ensaios *in vitro* mostraram que os epítomos dessa proteína apresentou reatividade imunológica contra as proteínas dos venenos de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), *L. similis* (Moenkhaus, 1898), *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e *L. laeta* (Nicolet, 1849). Os anticorpos obtidos a partir da imunização de coelhos com essa proteína também foram capazes de neutralizar as atividades esfingomielinásica, hialuronidásica e metaloproteinásica do veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934). Além disso, os coelhos imunizados com a proteína quimérica não apresentaram lesões necróticas após injeção de veneno de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934). Assim, os autores discutem a aplicação dessa proteína quimérica não tóxica na criação de uma possível vacina contra os efeitos do loxoscelismo (Lima et al., 2018).

Neste trabalho foram utilizadas técnicas de produção de proteínas recombinantes, bem como técnicas de imunoensaio para a identificação de epítomos imunogênicos das proteínas Loxtox.

1.4.3. Busca e desenvolvimento de inibidores específicos

Outro uso promissor das fosfolipases D é o desenvolvimento de inibidores específicos contra os componentes tóxicos do veneno. Em trabalhos recentes, as fosfolipases D demonstraram serem alvos importantes para a busca e o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras, o que pode fornecer novas estratégias terapêuticas para o loxoscelismo. Com base em dados de cristalografia estrutural de uma fosfolipase D recombinante de *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão, 1934) foi possível usar análises de docking e dinâmica molecular para realizar uma triagem *in silico* de moléculas inibidoras específicas (Chaves-Moreira et al., 2016). Foram identificados três compostos que apresentaram diferentes locais de ligação dentro da estrutura da molécula de PLD recombinante de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934): Suramina, que apresentou forte interação com os importantes resíduos catalíticos e aminoácidos envolvidos na ligação de íons metálicos; Vu0155056 e Vu0359595 que mostraram uma interação fraca com resíduos próximos ao sítio catalítico e resíduos de ligação ao substrato. Além disso, experimentos *in vitro* mostraram que 1 μM do composto Suramina foi capaz de inibir mais de 80% da atividade hemolítica e 10 μM de todos os compostos inibiram parcialmente a atividade esfingomielinásica da proteína recombinante. Ainda, análises *in vivo* com 300 μM dos compostos inibiram a dermonecrose e a resposta inflamatória na seguinte ordem de eficácia: Suramina > Vu0359595 > Vu0155056.

Lopes e colaboradores (2019) utilizaram informações estruturais de uma fosfolipase D recombinante de *L. laeta* (Nicolet, 1849) em análises de docking e identificaram inibidores da classe benzeno sulfonados competitivos e não competitivos que apresentaram resultados promissores de inibição das atividades das proteínas. Entre os inibidores identificados, dois inibidores não competitivos chamados 5 e 6 e um inibidor competitivo nomeado 1 apresentaram valores de inibição de atividade esfingomielinásica de $K_i = 0,49 \mu\text{M}$, $0,59 \mu\text{M}$ e $0,54 \mu\text{M}$, respectivamente. As análises de docking mostraram que apenas o composto 6 estabeleceu ligações com resíduos do sítio ativo (K^{93} e H^{47}). Testes *in vitro* evidenciaram que todos os três inibidores inibiram a ligação da proteína com a membrana de hemácias, inibindo a liberação de glicoforina C da membrana dos eritrócitos, o que é um mecanismo importante para a lise dependente do sistema complemento. Ainda, em testes de citotoxicidade em queratinócitos os autores

observaram que os três inibidores diminuíram os níveis de MMP9 e os inibidores 5 e 6 foram capazes de inibir a ligação da proteína recombinante com a membrana celular e assim reduziram significativamente a citotoxicidade da proteína. Além disso, testes *in vivo* mostraram que os inibidores 5 e 6 reduziram as lesões dermonecróticas, degradação de colágeno, hemorragia e inflamação até 72 horas após a injeção do veneno de *L. laeta* (Nicolet, 1849) (Lopes et al., 2019).

1.4.4. Aplicações Biotecnológicas

A identificação de componentes biologicamente ativos presentes em venenos tem sido facilitada pelos avanços tecnológicos e o uso de novas técnicas de biologia molecular, bioinformática e proteômica (Wilson e Dly, 2018; Herzig et al., 2020). O acesso à ampla biblioteca de moléculas naturais presente em venenos potencializou a descoberta de ferramentas biotecnológicas para o estudo de sistemas fisiológicos, bem como tem proporcionado o desenvolvimento de novas moléculas com propriedades farmacológicas, as quais podem resultar em novas drogas (Herzig et al., 2020). Nos últimos anos, sete fármacos baseados em componentes do veneno de diferentes espécies de animais tiveram seu uso aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e outras agências reguladoras para o tratamento de diferentes doenças como hipertensão, diabetes, doenças cardíacas, dor crônica, entre outras (King et al., 2011; Pennington et al., 2018). Assim, torna-se evidente a importância do estudo do potencial de aplicação farmacêutica de moléculas derivadas de veneno.

As fosfolipases D do veneno de *Loxosceles* atuam em diferentes fosfolipídeos e lisofosfolipídeos incluindo esfingomiéline, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina e liso-PAF (Lee e Lynch, 2005). A atividade enzimática das fosfolipases D gera diferentes metabólitos bioativos como C1P, LPA e cPA. Os metabólitos C1P e LPA estão envolvidos com importantes processos biológicos e fisiopatológicos incluindo agregação plaquetária, secreção de citocinas e quimiocinas, permeabilidade endotelial, quimiotaxia e influxo de cálcio em eritrócitos que leva a hemólise (Choi et al., 2010; Horta et al., 2013; Rivera et al., 2015). O cPA é um lisofosfolipídeo análogo ao LPA que possui várias funções biológicas como: regulação do ciclo celular, inibição de células tumorais e metástases e regulação da

diferenciação e sobrevivência de células neuronais (Fujiwara, 2008). Assim, a atividade das fosfolipases D e a geração de metabólitos biologicamente ativos fornecem novas abordagens como potencial alvo biotecnológico para o estudo do metabolismo de lipídeos, aplicação no estudo de vias que visam influenciar as respostas biológicas mediadas por essas enzimas, bem como para o desenvolvimento de novas drogas ou moléculas terapêuticas (Gremski et al., 2020).

Nessa perspectiva, Siqueira e colaboradores (2019) construíram uma proteína quimérica nomeada Rechistatin contendo a sequência de uma fosfolipase D da aranha *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e a sequência de uma desintegrina da serpente *Echis carinatus* (Schneider, 1801). Os autores avaliaram o potencial citotóxico da Rechistatin em células de melanoma (B16510) e observaram que em comparação a proteína desintegrina, a nova molécula quimérica apresentava maiores potenciais citotóxicos em baixas concentrações (1 e 3 μM). Além disso, a sequência de desintegrina presente na quimera foi capaz de inibir os efeitos de agregação plaquetária promovidos pela fosfolipase D. Assim, os autores concluíram que a sequência de fosfolipase D aumentou o potencial citotóxico das desintegrinas em melanócitos quando associadas em uma proteína quimérica (Siqueira et al., 2019).

Outras aplicações biotecnológicas para as fosfolipases D de *Loxosceles* também foram sugeridas, incluindo o uso dessas toxinas como reagentes de controle positivo em protocolos de pesquisa que envolve análises da modulação do sistema complemento, liberação de mediadores inflamatórios e alterações em plaquetas, hemácias, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, linfócitos e células renais (Gremski et al., 2020). Além disso, foi evidenciada a atividade parálitica e inseticida das fosfolipases D de *L. arizonica* (Gertsch & Mulaik, 1940) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) em grilos (Zobbel-Thropp et al., 2012; Gremski et al., 2020). Portanto, mais estudos são necessários para a compreensão do papel biológico dessas enzimas no mecanismo de predação das aranhas *Loxosceles* e na potencial atividade dessas proteínas como agente inseticida.

2. Justificativa e relevância

O loxoscelismo é uma condição de grande importância epidemiológica no Brasil, sendo que o número de casos de loxoscelismo tem aumentado na região Sudeste e outras regiões do país. Mudanças no habitat das aranhas *Loxosceles* associado à capacidade de expansão territorial dessas aranhas também são fatores pertinentes relacionados com a colonização sinantrópica do gênero. Assim, os achados das *L. similis* (Moenkhaus, 1898) no interior de residências do município de Belo Horizonte ressalta a importância do estudo de caracterização dos componentes do veneno para a melhor compreensão dos efeitos desses nos mecanismos patofisiológicos do loxoscelismo. As fosfolipases D estão entre as toxinas de maior expressão na glândula de veneno das *L. similis* (Moenkhaus, 1898) e são os componentes do veneno que causam os principais efeitos observados no loxoscelismo, entretanto o mecanismo de ação das fosfolipases D de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) bem como a importância dessas toxinas para o processo do envenenamento ainda não estão totalmente esclarecidos. Desse modo a produção de isoformas recombinantes de fosfolipases D obtidas a partir dos dados de transcriptoma de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) é um importante passo para a compreensão dos efeitos dessas toxinas nos processos do loxoscelismo. Ainda, a obtenção das toxinas fosfolipases D recombinantes isoladas propicia maiores esclarecimentos a respeito da atividade dessas enzimas.

Atualmente a terapia com antivenenos é a única forma de tratamento específico para o loxoscelismo. Entretanto existem desafios para a obtenção de quantidades suficientes do veneno de aranhas *Loxosceles* para o uso em protocolos de hiperimunização, os quais também sofrem com os efeitos dos componentes tóxicos do veneno. Além disso, a manutenção dessas aranhas em cativeiro para a extração do veneno é um processo dificultado, visto que muitas aranhas morrem após os procedimentos para obtenção do veneno. Dessa forma existe a necessidade de estabelecer novas técnicas para a produção de antivenenos. Nessa perspectiva, a obtenção em grandes quantidades de fosfolipases D recombinantes fornece antígenos para a produção de anticorpos e a identificação de regiões imunogênicas, tendo em vista a produção de soros mais eficazes para a neutralização dos efeitos tóxicos do veneno.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo produzir Loxtox recombinantes de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), caracterizar as propriedades moleculares, bioquímicas e imunológicas das novas toxinas e analisar a capacidade dos soros anti-Loxtox de reduzir os efeitos deletérios do veneno.

3.2 Objetivos específicos

- a) Obter toxinas Loxtox recombinantes isoladas.
- b) Caracterizar as diferenças moleculares das sequências e estruturas de Loxtox, a capacidade de promover alterações *in vivo* em animais e avaliar a atividade enzimática *in vitro*.
- c) Obter anticorpos policlonais contra cada toxina Loxtox recombinante.
- d) Identificar e avaliar regiões antigênicas nas sequências das toxinas recombinantes.
- e) Avaliar o potencial de cada anti-soro para neutralizar os principais efeitos do loxoscelismo dérmico e sistêmico.

4. Material e Métodos

4.1 Aranhas e veneno

Vinte e cinco aranhas *L. similis* (Moenkhaus, 1898) adultas foram coletadas no Parque Estadual do Sumidouro, Lagoa Santa (Minas Gerais, Brasil), na caverna turística Gruta da Lapinha (43 ° 57 'Oeste, 19 ° 33' Sul). As amostras foram coletadas com licença aprovada do Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF/MG, número de licença 047.2012).

As glândulas de veneno foram removidas, maceradas com auxílio de *beads* de vidro e o veneno foi extraído em água ultra pura grau biologia molecular (Pht). As toxinas solúveis foram obtidas após centrifugação a 10.000 g por 10 min. As

5'CTCGAGCTTCTGCCAGGGATAGTCCTCATACGTTGC). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com tampão de reação contendo o cDNA e os primers projetados usando o kit KAPA HiFi HotStart DNA Polimerase (KAPA Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. O produto de PCR foi inserido no plasmídeo pCR[™] 2.1-TOPO® TA Cloning vector (**FIGURA 7 B**; Life Technologies) de acordo com as especificações do fabricante. A construção contendo a Loxtox s11A foi eletrotransformada na cepa de *E. coli* XL1Blue (Pht), depois o plasmídeo purificado foi digerido com a enzima de restrição *Xho*I e o fragmento maduro foi clonado usando o sítio de restrição *Xho*I do vetor pET26-b (**FIGURA 7 C**).

As sequências nucleotídicas das construções com Loxtox s1A e Loxtox s11A foram verificadas por sequenciamento de Sanger usando um kit de reação ABI PRISM BigDye terminador (Applied-Biosystems) em um sequenciador automático 3130 (Applied Biosystems).

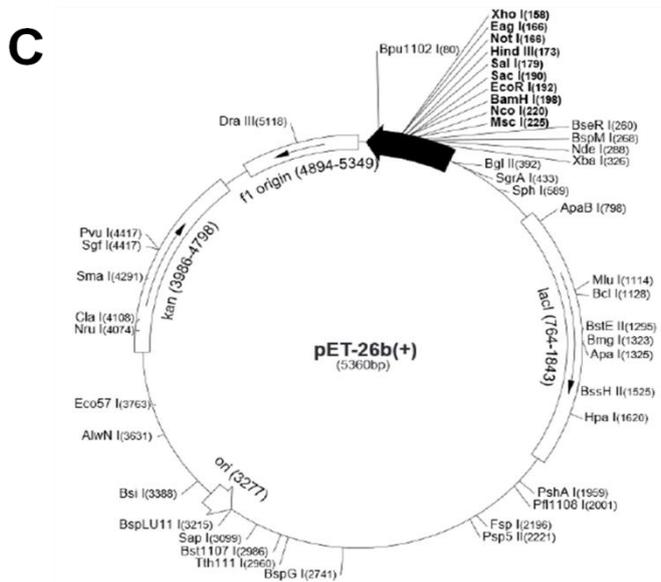
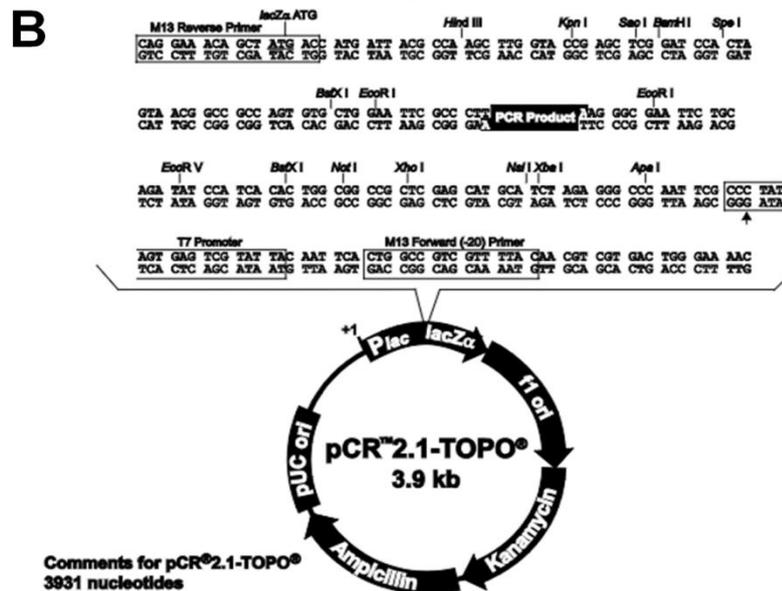
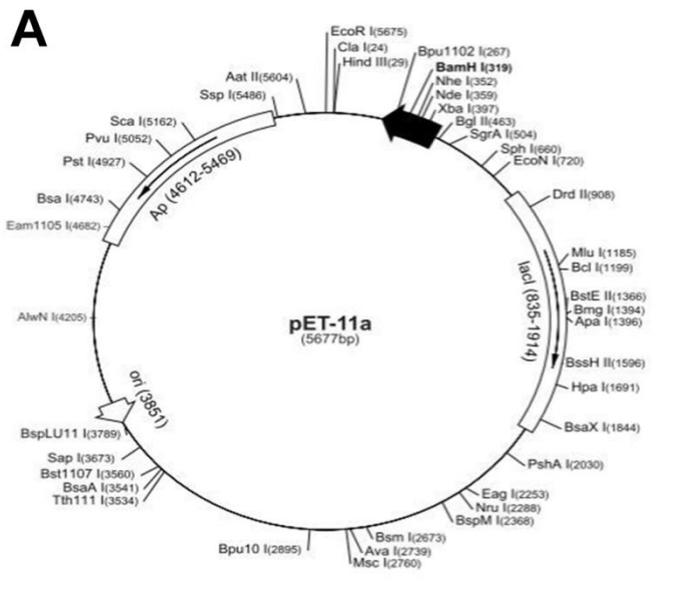


FIGURA 7 Mapa dos vetores utilizados. **A)** Vetor de expressão pET11-a. **B)** Vetor de clonagem TOPO TA Cloning. **C)** Vetor de expresso pET26-b. (Fonte: Novagen; Invitrogen)

4.4 Alinhamento múltiplo

As sequências finais de aminoácidos das toxinas recombinantes foram deduzidas e analisadas com as ferramentas *Translate Tool* e *Prot-Param* disponíveis *online* no ExPASy World Wide Web Server (<http://www.expasy.org>). As sequências de aminoácidos derivadas das toxinas recombinantes foram alinhadas com as sequências de outras fosfolipases D de diferentes espécies de aranhas, incluindo *Loxosceles gaucho* (Gertsch, 1967) (UniProt: K9USW8; Magalhães et al., 2013), *Loxosceles reclusa* (Gertsch & Mulaik, 1940) (UniProt: P0CE79; Lee e Lynch, 2005), *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (UniProt: P0CE80, Q2XQ09; da Silveira et al., 2006), *Loxosceles boneti* (Gertsch, 1958) (UniProt: Q5YD76; Ramos-Cerrilo et al., 2004) e *Sicarius terrosus* (Nicolet, 1849) (UniProt: A0A0D4WV12; Lajoie et al., 2015b) utilizando ClustalW no *software* Mega 7 (Kumar et al., 2016). As identidades das sequências foram analisadas usando BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.5 Expressão e purificação de toxinas recombinantes

As construções da recLoxtox s1A e da recLoxtox s11A foram respectivamente eletrotransformadas nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) (Pht) e *E. coli* Origami 2 (DE3) (New England Biolabs). Uma única colônia de cada linhagem de bactéria transformada foi inoculada em 10mL de caldo LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina. As culturas foram incubadas a 37 °C sob rotação de 200 rpm por 24 h. Após a incubação, os 10 mL de meio foram inoculados em 1 L de meio caldo LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina. As culturas foram incubadas a 37 °C sob rotação de 200 rpm até a OD_{600nm} atingir 0,6. A expressão foi induzida pela adição de IPTG em uma concentração final de 0,06 mM por 16 h.

As células de *E. coli* foram centrifugadas (3000 g por 10 min, a 4°C) e ressuspendidas em tampão de lise ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, enzima 100 µg/mL, pH 7,4). As culturas foram sonicadas para liberação total das toxinas recombinantes. Após a lise das células BL21 (DE3) e Origami 2 (DE3), recLoxtox s1A e recLoxtox s11A foram respectivamente recuperadas na forma solúvel e insolúvel. Em seguida, a proteína recLoxtox s11A insolúvel foi separada por centrifugação (3000 g por 10 min, a 4 °C) e a proteína foi solubilizada por incubação *overnight* em tampão de ligação contendo uréia 6 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, NaCl 500 mM, 20 mM imidazol, uréia 6 M, pH 7,4).

A purificação da recLoxtox s1A e da recLoxtox s11A foi realizada por cromatografia de afinidade usando a coluna HP HisTrap™ 5mL (GE Healthcare Lifesciences) de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, a uréia 6 M foi gradualmente removida durante a purificação da recLoxtox s11A e a proteína purificada solúvel foi coletada no sobrenadante. As toxinas recombinantes foram submetidas à dessalinização por cromatografia usando uma coluna de dessalinização PD-10 (GE Healthcare Lifesciences) seguindo as instruções do fabricante.

4.6 Eletroforese

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% sob condições redutoras (5% β-mercaptoetanol). Em seguida, o conteúdo dos géis foi revelado com adição de solução corante de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) 0,25% por 20 minutos e em seguida lavados com solução descorante (45% álcool metílico, 9% ácido acético glacial).

4.7 Protocolos de imunização

Coelhos adultos fêmeas da raça Nova Zelândia ($n = 9$, 16 semanas de idade, 2,0-2,5 kg) foram utilizados para a produção de soros imunes. Após a coleta do soro pré-imune de cada animal, três animais foram injetados subcutaneamente com 50 µg de recLoxtox s1A (grupo 1) e três animais receberam 50 µg de recLoxtox s11A

(grupo 2), enquanto outros três animais (grupo 3) receberam uma mistura contendo recLoxtox s1A e recLoxtox s11A (25 µg de cada proteína) emulsionadas em adjuvante completo de Freund. Foram injetados quatro reforços subcutâneos de recLoxtox s1A (80 µg) ou recLoxtox s11A (80 µg) em animais dos grupos 1 e 2, respectivamente, enquanto os animais do grupo 3 receberam quatro reforços de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A (40 µg de cada proteína) emulsionado em adjuvante incompleto de Freund em intervalos de quinze dias. Amostras de sangue foram obtidas uma semana após cada reforço. O soro foi separado por centrifugação a 300g por 20 minutos e conservado a -20°C até o uso.

4.8 Imunoensaios

4.8.1 ELISA

O ELISA foi conduzido como descrito anteriormente por Chávez-Olórtegui e colaboradores (1991). As placas de microtitulação (BD Falcon) foram incubadas *overnight* a 4 °C com 100 µl por poço de uma solução a 5 µg/mL de recLoxtox s1A, recLoxtox s11A ou veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) diluídos em tampão de incubação (bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6). Após o bloqueio (caseína em pó a 2% em PBS) e a lavagem (Tween 20-PBS a 0,05%), foi adicionado soro pré-imune ou os soros imunes em diluição seriada (1:100 a 1:256.000) a cada placa, incubando por 1 h a 37 °C. A reatividade cruzada das toxinas recombinantes com antiveneno foi determinada usando soro antiveneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) produzido anteriormente por Chatzaki et al. (2012). As análises foram feitas em triplicata e os valores de absorbância foram determinados a 492 nm com um leitor de placas ELISA BIO-RAD 680.

4.8.2 *Western-blotting*

Amostras de 10 µg de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), recLoxtox s1A e recLoxtox s11A foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE a 12% sob

condições redutoras (5% β -mercaptoetanol) e submetidas ao ensaio de Western Blotting. Após eletroforese, o conteúdo do gel foi transferido para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (albumina sérica bovina a 5% (BSA) em TBS 1X) por 1h a 25 °C e incubadas *overnight* a 25 °C com cada soro imune obtido anteriormente, soro antiveneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), ou soro pré-imune diluídos 1: 5000 em TBST 1x (BSA a 5% em TBS Tween-20). As membranas foram lavadas com tampão de lavagem (TBS 1X) e incubadas por 2 h a 25 °C com IgG anti-coelho conjugado com fluorescência diluído 1:4000 em TBST 1x. Após a lavagem das membranas com TBST, as membranas foram analisadas usando um scanner fluorescente (GE Healthcare Lifesciences).

4.8.3 Síntese de peptídeos na membrana de celulose pelo método de Spot

Dois conjuntos de pentadecapeptídeos sobrepostos por cinco resíduos cobrindo as sequências de aminoácidos da recLoxtox s1A e da recLoxtox s11A foram sintetizados utilizando o sintetizador automático ResPep SL (IntravisAG, Bioanalytical Instruments) de acordo com o protocolo descrito anteriormente por Laune e colaboradores (2002). Utilizou-se um sintetizador SPOT Multiprep automático para síntese automatizada de peptídeos em membrana de celulose (Intravis), utilizando aminoácidos Fmoc e N-hidroxibenzotriazol (Novabiochem). As sínteses dos peptídeos nas membranas foram realizadas em colaboração com o professor Dr. Ricardo A. M. Ávila da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

4.8.4 Imunoensaios de Spot

Os peptídeos ligados à membrana foram saturados durante a noite com BSA a 3% e incubados com soro anti-recLoxtox s1A, soro anti-recLoxtox s11A ou soro anti-recLoxtox s1A/S11A (diluídos 1:200) por 1 h a 25 °C. Também foi determinada a reatividade antigênica contra o soro anti-veneno de *L. similis* (diluído 1:50) e as membranas foram incubadas por 1 h a 25 °C. O soro pré-imune foi utilizado como controle comparativo da reação peptídica dos imunoensaios de Spot. A ligação do

anticorpo foi determinada utilizando anticorpo anti-coelho conjugado com fosfato alcalino (Sigma) diluído 1:9.000, incubando durante 1 h a 25 °C. O imunoenensaio foi continuado como descrito por Lima e colaboradores (2018). As intensidades dos ensaios de Spot para cada soro imune analisado foram analisadas usando o software ImageJ (Schneider et al., 2012). O valor de reatividade para o soro pré-imune foi utilizado como controle negativo da reação e foi deduzido do valor dos demais soros para cálculo da reatividade de intensidade dos Spots.

4.9 Modelagem molecular

As estruturas tridimensionais da recLoxtox s1A e recLoxtoxs11A foram modeladas usando o *software* SWISS-MODEL (Kiefer et al., 2009; <http://swissmodel.expasy.org/>). As proteínas cristalizadas LiRecDT1 (PDB: 3RLH, Ullah et al., 2011) e StSicTox_β1i (PDB: 4QA6X, Lajoie et al., 2015b) foram usadas para construir os modelos das toxinas recombinantes. Os epítomos mapeados pelo imunoenensaio Spot foram localizados e visualizados nos modelos 3D com o *software* PyMol (Delano, 2002). Os modelos foram validados através da análise do gráfico de Ramachandran disponibilizado pelo *software* SWISS-MODEL.

4.10 Atividade da esfingomielinase e ensaio de neutralização *in vitro*

A atividade de esfingomielinase das toxinas recombinantes foi determinada pré-incubando esfingomielina (10 μM) com 10 μg de recLoxtox s1A ou recLoxtox s11A em tampão de reação (Tris-HCl 0,1M; MgCl₂ 10mM) em diferentes condições de pH (4,6; 5,6; 6,4; 7,4 e 8) durante 1 h a 37 °C. O veneno de *L. similis* (10 μg) e PBS foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. A neutralização *in vitro* da atividade esfingomielinásica do veneno foi realizada pré-incubando o veneno de *L. similis* (3 μg) com 100 μl de soro anti-recLoxtox s1A, soro anti-recLoxtox s11A ou soro anti-recLoxtox s1A/s11A em diferentes diluições (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000) por 1h a 37 ° C. O veneno de *L. similis* (3 μg) pré-incubado com 100 μl de soro pré-imune (1:10 diluído) ou 100 μl de PBS foi utilizado como controle da neutralização da atividade enzimática. Os ensaios foram continuados

usando o Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen), incubando amostras com 100 µl de solução de trabalho (1 µM AmplexRed; 0,002 U/ml de peroxidase de rábano silvestre; 0,002 U/ml de colina oxidase; 0,002 U/ml de colina oxidase; 0,008 U/ml de fosfatase alcalina; 0,1M Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; pH 7,4) por 30 min a 37°C, protegido da luz, de acordo com o protocolo do fabricante. As análises foram analisadas em cinco repetições e a fluorescência foi medida com o leitor de microplacas de fluorescência Cary Eclipse (Varian, Agilent Technologies) usando excitação a 530 nm e detecção a 590 nm.

4.11 Efeitos cutâneos de toxinas recombinantes e neutralização *in vivo* do veneno de *L.similis* (Moenkhaus, 1898)

Coelhos adultos fêmeas da raça Nova Zelândia (16 semanas de idade, 2,0-2,5 kg) foram submetidos à tricotomia na região interescapular e utilizados para efeitos comparativos de toxinas recombinantes ($n = 8$) e ensaios de neutralização ($n = 12$). Para análise de caracterização *in vivo*, os animais receberam injeções intradérmicas com 20 µg de recLoxtox s1A (grupo 1, $n = 4$) ou 20 µg de recLoxtox s11A (grupo 2, $n = 4$) diluídas em PBS em três pontos equidistantes: ponto 1 (injeção as 0 h após tricotomia e análise as 48 h após injeção), ponto 2 (injeção as 24 h após tricotomia e análise as 24 h após injeção), ponto 3 (injeções as 44 h após tricotomia e análise as 4 h após injeção intradérmica) (**TABELA 1**). Para fins comparativos, os mesmos oito animais foram injetados com 3 µg de veneno de *L. similis* (controle positivo) e PBS (controle negativo) em três pontos equidistante na região interescapular (totalizando nove injeções/ animal) e em tempos de injeção iguais aos descritos para as toxinas recombinantes. Um animal diferente foi injetado com 10 µg de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**TABELA 1**). A dose mínima de 3 µg do veneno foi utilizada para prevenir o sofrimento animal dado que os mesmos animais foram utilizados para as análises das toxinas recombinantes e do veneno. Dois diâmetros perpendiculares das lesões, incluindo necrose e edema, foram medidos com paquímetro nas 48h após a injeção do ponto 1.

TABELA 1 Esquema de injeções intradérmicas para análise de caracterização *in vivo*

Grupo de animais	Injeção de toxina recombinantes (parte esquerda da região dorsal)			Injeção do veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898) (parte direita da região dorsal)			Injeção de PBS (parte central da região dorsal)		
	P 1/ 0h ¹ / 48h ²	P 2/ 24h ¹ / 24h ²	P 3/ 44h ¹ / 4h ²	P 1/ 0h ¹ / 48h ²	P 2/ 24h ¹ / 24h ²	P 3/ 44h ¹ / 4h ²	P 1/ 0h ¹ / 48h ²	P 2/ 24h ¹ / 24h ²	P 3/ 44h ¹ / 4h ²
Grupo 1 n=4	s1A 20 µg + PBS 100 µl	s1A 20 µg + PBS 100 µl	s1A 20 µg + PBS 100 µl	Veneno 3 µg + PBS 100 µl	Veneno 3 µg + PBS 100 µl	Veneno 3 µg + PBS 100 µl	PBS 100 µl	PBS 100 µl	PBS 100 µl
Grupo 2 n=4	s11A 20 µg + PBS 100 µl	s11A 20 µg + PBS 100 µl	s11A 20 µg + PBS 100 µl	Veneno 3 µg + PBS 100 µl	Veneno 3 µg + PBS 100 µl	Veneno 3 µg + PBS 100 µl	PBS 100 µl	PBS 100 µl	PBS 100 µl
1 animal				Veneno 10 µg + PBS 100 µl	Veneno 10 µg + PBS 100 µl	Veneno 10 µg + PBS 100 µl			

P 1 = ponto 1; P 2 = ponto 2; P 3 = ponto 3; ¹Injeção após tricotomia. ² Tempo de análise após injeção.

O efeito neutralizante *in vivo* de cada soro imune contra o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) foi realizado como descrito anteriormente por Chatzaki e colaboradores (2012), com modificações. O veneno de *L. similis* (3 µg) foi pré-incubado com 100 µl de soro anti-recLoxtox s1A (grupo 1), soro anti-recLoxtox s11A (grupo 2) ou soro anti-recLoxtox s1A/s11A (grupo 3) por 1 h a 37 °C. Coelhos tricotomizados ($n = 12$, 4/grupo) receberam injeções intradérmicas com as amostras pré-incubadas em três pontos equidistantes: ponto 1 (injeção as 0 h após tricotomia e análise as 48 h após injeção), ponto 2 (injeção as 24 h após tricotomia e análise as 24 h após injeção), ponto 3 (injeção as 44 h após tricotomia e análise as 4 h após injeção) (**TABELA 2**). O veneno de *L. similis* (3 µg) pré-incubado com soro pré-imune (100 µl) foi utilizado como controle negativo para neutralização e injetado intradérmicamente nos mesmos animais em três pontos equidistantes simultaneamente com os soros imunes (**TABELA 2**). Dois diâmetros perpendiculares da lesão necrótica e do edema foram medidos separadamente com paquímetro após 48h da injeção do ponto 1.

TABELA 2 Esquema de injeções intradérmicas para análise de neutralização *in vivo*

Grupo de animais	Injeção de veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898) pré-incubado por 1h at 37°C com soro imune (parte esquerda da região dorsal)			Injeção de veneno de <i>L. similis</i> (Moenkhaus, 1898) pré-incubado por 1h at 37°C com soro pré-imune (parte direita da região dorsal)		
	P 1/ 0h ¹ /48h ²	P 2/ 24h ¹ /24h ²	P 3/ 44h ¹ /4h ²	P 1/ 0h ¹ /48h ²	P 2/ 24h ¹ /24h ²	P 3/ 44h ¹ /4h ²
Grupo 1 n=4	Veneno 3 µg + soro anti-s1A 100 µl	Veneno 3 µg + soro anti-s1A 100 µl	Veneno 3 µg + soro anti-s1A 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl
Grupo 2 n=4	Veneno 3 µg + soro anti-s11A 100 µl	Veneno 3 µg + soro anti-s11A 100 µl	Veneno 3 µg + soro anti-s11A 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl
Grupo 3 n=4	Veneno 3 µg + soro anti-s1/s11A 100 µl	Veneno 3 µg + soro anti-s1/s11A 100 µl	Veneno 3 µg + soro anti-s1/11A 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl	Veneno 3 µg + soro pré-imune 100 µl

P 1 = ponto 1; P 2 = ponto 2; P 3 = ponto 3; ¹Injeção após tricotomia. ² Tempo de análise após injeção.

4.12 Análises macroscópicas, histológicas e morfométricas

Após 48 h da injeção no ponto 1, os animais foram eutanaziados com injeção intravenosa de sobredose de pentobarbital (90 mg/kg, Syntec) e amostras de pele foram coletadas para análises histológicas. As amostras de pele foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, pH 7,4 e avaliadas morfológicamente como descrito anteriormente por Chatzaki e colaboradores (2012). Cortes finos (4 µm) foram corados com hematoxilina-eosina e avaliados por microscopia óptica. Análises microscópicas e quantitativas do infiltrado inflamatório foram analisadas. O número mínimo representativo de campos microscópicos por amostra foi determinado usando uma lâmina a partir da qual o número de células inflamatórias por campo foi analisado e registrado (Moro et al, 2003). O tamanho da amostra foi considerado como o número representativo mínimo de 35 campos por lâmina e relatado como a média ± SEM. As imagens foram adquiridas para realizar a análise

morfométrica usando o software ImageJ, no qual foi utilizado a ferramenta de Grade para a padronização da contagem de células inflamatórias (Schneider et al., 2012).

4.13 Análises estatísticas dos dados

Os resultados são expressos como a média e o erro padrão da média (S.E.M.). O modelo de regressão linear (LM) seguido do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas foi usada para comparar as médias nos ensaios de esfingomielinase e neutralização *in vitro*. O modelo misto linear (LME) seguido do pós-teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas das médias nas análises de diâmetros e morfometria das lesões nos ensaios de caracterização e neutralização *in vivo*. As análises estatísticas foram realizadas usando os pacotes “nlme” e “emmeans” no software R 3.6.1. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Sequências das toxinas recombinantes e alinhamento múltiplo

A sequência madura de Loxtox s1A foi sintetizada e clonada em pET11-a (+) pela empresa GeneScript e consiste em 894 pb, codificando 297 resíduos incluindo oito histidinas na região N-terminal (**FIGURA 8 A**). Já a sequência madura de Loxtox s11A foi clonada no vetor de expressão pET26-b (+) no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares e consiste em 1.005 pb, codificando 334 aminoácidos, incluindo 6 histidinas na região N-terminal e uma sequência sinal para expressão no periplasma “pelB” (**FIGURA 8 B**). A massa molecular calculada e o pI das sequências maduras previstas foram de 32 kDa com pI 6,01 para Loxtox s1A e 32,4 kDa com pI 5,2 para Loxtox s11A.

UniProt: P0CE79) e com LiRecDT1 de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (> 80%, UniProt: P0CE80). Por outro lado, os resíduos da recLoxtox s11A apresentaram maior identidade com LiRecDT3 de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (> 87%, UniProt: Q2XQ09), com Lb3 de *L. boneti* (Gertsch, 1958) (> 85%, UniProt: Q5YD76) e com StSicTox_βIB1i de *Sicarius terrosus* (Nicolet, 1849) (> 66%, UniProt: A0A0D4WV12).

Os resíduos de histidina (indicados em preto) e cisteína (indicados em amarelo com respectivas ligações dissulfeto apontada por setas) envolvidos com a formação de pontes dissulfeto e atividade catalítica estão bem conservado nas sequências das Loxtox e PLD alinhadas (H¹⁶, H⁵², C⁵⁶, C⁵⁸, C⁶² e C²⁰¹; **FIGURA 9**). Os resíduos importantes para a coordenação da atividade catalítica envolvendo a presença de um íon Mg²⁺ também estão conservados em todas as sequências mostradas no alinhamento (resíduos representados em verde: E³⁶, D³⁸ e D⁹⁶; **FIGURA 9**). Todos os resíduos envolvidos na estabilização da enzima por meio da formação de uma rede de hidrogênio durante a catálise estão conservados nas sequências das Loxtox e outras PLDs (resíduos indicados em preto D⁴⁷, K⁹⁸, Y^{227/228}, W^{229/230}, D^{232/233}; **FIGURA 9**). Além dos resíduos importantes para a atividade catalítica, também foi observado que na porção C-terminal das sequências um motivo contendo os resíduos A^{272/273}, T^{273/274}, Y^{274/275}, D^{276/277}, N²⁷⁷/Y²⁷⁸, P^{278/279} e W^{279/280} foi conservado entre todas as PLDs alinhadas (**FIGURA 9**).

```

Loxtox s1A (Loxosceles similis) VGERADKRRPIWIMGHMVNSLAQIDFVNLGNSIETDVSFDKQANPEYTMHGIPDGRSHTSTNFNDFLKGLRKAATPGDSKYHEKLLVVFDDRTGSLYDNOAYD 109
Loxtox s11A (Loxosceles similis) VVERADSRKRPDIWIDIAHMVNDLELVDEYLDGANGLEDVDFEFDKGTAKEMVHGVPDGRSCTRSEEFKYMDYIRQLTTPGNPKFRSOLIMLIMDDRLKGIIEPNVAYA 109
LgRec1 (Loxosceles gaucho) ----ADNRRPIWIMGHMVNSLAQIDFVNLGNSIETDVSFDKQANPEYTMHGIPDGRALHSTKFNDFLKGLRKKVTPGD SKYLEKLLVVFDDRTGSLYDNOAYD 105
Lr2 (Loxosceles reclusa) VAERA-NKRPFIWIMGHMVNAIYQIDFVNLGANSIETDVSFDKANPEYTMHGVPDGRSLKWEYFSDFLKGLRKAATPGDSKYHAKLLVVFDDRTGSLYDNOAYD 108
LiRecDT1 (Loxosceles intermedia) DEERAGNRRPIWIMGHMVNAIGQIDFVNLGANSIETDVSFDNANPEYTMHGIPDGRNKKYENFNDFLKGLRSATTPGNPKYQEKLLVVFDDRTGSLYDNOAND 109
LiRecDT3 (Loxosceles intermedia) AAERADSRKRPDIWIDIAHMVNDLGLVDEYLDGANGLEDVAFADGTADKMMVHGVPDGRSCTRTEGFTKYMDYIRQLTTPGNPKFKSCLILLIMDDRLKNGIIEPNVAYA 109
Lb3 (Loxosceles boneti) ----AXRPFPIWIDVAHMVNDLELVDEYLDGANGLEDVAFSDDGTAEKMMVHGVPDGRSKRTETFTKYMDYIRELTTPGNPKFNLLILLIMDDRLKNGIIEPNVAYA 105
StSic_βIBli (Sicarius terrosus) ----GDSRRPIWNIAMHMVNDLDELVDEYLDGANGLEDVVEFSKSGTALRTVHGVPDGRSTRSEKFSKYLDYIRQLTTPGNPKFRSRILLVLDLRLNPLSSSAAYN 105

```



```

Loxtox s1A (Loxosceles similis) AGTKLAKNLLQHYWNNNGNNGGRAYIILSIPNLNHYKLTGPKETLKNEG-HEELLEKVGHDVDFSGNDDISDVQKTYNKAAGVTGHVWQSDGITNLLRGLTRVKAAVANR- 216
Loxtox s11A (Loxosceles similis) AGKSVAEKLLSSYWQNGKSGARAYIVLSLETITRPFITKGFDAITASG-HEELFEKIGWDFSGNEDLDGDIRRMVQYGIETHIWQGGGITNLTARGDYRLKEALKKN 217
LgRec1 (Loxosceles gaucho) AGTKLAKNLLQHYWNNNGNNGGRAYIILSIPNLNHYKLTGPKETLKNEG-HEELLEKVGHDVDFSGNDDISDVQKTYNKAAGVTGHVWQSDGITNLLRGLTRVKAAVANR- 212
Lr2 (Loxosceles reclusa) AGKKLAKNLLKHYWNNNGNNGGRAYIVLSIPDLNHYKLTGPKETLKSEG-HEPELMDKVGHDVDFSGNDAIGDVGNAYKKAAGVTGHVWQSDGITNLLRGLSRVKEAVKNR- 215
LiRecDT1 (Loxosceles intermedia) AGKKLAKNLLQHYWNNNGNNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGPKDQLTKDG-HEPELMDKVGHDVDFSGNDDIGDVGKAYKKAAGITGHVWQSDGITNLLPRGLSRVNAAVANR- 216
LiRecDT3 (Loxosceles intermedia) AGKSVAEKLLSGYWQNGKSGARAYIVLSLETITRPNFTSGFRDAIKASG-HEELFEKIGWDFSGNEDLGEIRRVVQKYGIETHIWQGGGITNLLPRGDYRLTEAMKKN 217
Lb3 (Loxosceles boneti) AGKSVAEKLLSSYWQNGESGARAYIVLSLETITRPEFINGFRDAIKASG-HEELFEKIGWDFSGNEDLDGDIRRVVQKYGIDEHIWQGGGITNLLPRGDYRLTEAMKKN 213
StSic_βIBli (Sicarius terrosus) AGADVARNLLDNVWQRGDSKARAYIVLSLETIAGAEPITGFRDTRMKKEGDFEKYYDKIGWDFSGNEDLGKIRDVLESHGIREHIWQGGGITNLLPRDDNRLKQAIISRY 214

```



Loxtox s1A (<i>Loxosceles similis</i>)	DSGSGIINKVYYTVDKRRATTRDSLDAKVDGVMNTNYEDVIVDVLNEDAYKNKFRVATYEDNPWETFKE	284	100%	44.84%
Loxtox s11A (<i>Loxosceles similis</i>)	DPDYKYTLKVVYTWISIDKNSIRHALRLGVDAIMTNYEDVKSIHQSEFSGSHRMATYEDYEWQK---	282	44.84%	100%
LgRec1 (<i>Loxosceles gaucho</i>)	DSGSGIINKVYYTVDKRRQSTRDLDANVDGIMTNYEDITVEILNEAAYKKKFRIATYEDNPWETFKE	280	92.47%	44.77%
Lr2 (<i>Loxosceles reclusa</i>)	DSSNGFINKVYYTVDKRRATTRDALDAGVDGVMNTNYEDVITDVLNESAYKAKFRIATYDDNPWETFKN	283	84.10%	45.91%
LiRecDT1 (<i>Loxosceles intermedia</i>)	DSANGFINKVYYTVDKRRSTRDALDAGVDGIMTNYEDVITDVLNEAAYKKKFRVATYDDNPWETFKE	284	80.85%	45.68%
LiRecDT3 (<i>Loxosceles intermedia</i>)	DPNYKYTLKVVYTWISIDKESSIRNALRLGVDVMTNYEARVKSILNESEFSGTHRMATYEDNPWQK---	282	45.2%	87.23%
Lb3 (<i>Loxosceles boneti</i>)	DPDYKYTEKVVYTWISIDKEASIRNALRLGVDVMTNYEARVKSILNESEFSGTHRMATYEDNPWQK---	278	45.85%	84.53%
StSic_βIBli (<i>Sicarius terrosus</i>)	SPTYVYADKVVYTWISIDKESSIRNALRLGVDGVMNTNYEARVIVLGEREFSGKLRLLATYDDNPWEK---	279	47.48%	66.31%

Identidade s1A Identidade s11A

FIGURA 9 Alinhamento múltiplo das sequências maduras de Loxtox s1A e Loxtox s11A com PLDs de outras espécies de *Loxosceles*. Os resíduos importantes do sítio de ligação com o íon Mg^{2+} estão mostrados em verde. Os resíduos importantes para a atividade catalítica estão mostrados em preto. As cisteínas relacionadas com a formação de ponte dissulfeto estão mostradas em amarelo. Triângulos pretos e cinzas indicam a correspondência da ligação dissulfeto entre os pares de cisteínas. Os resíduos conservados são mostrados em tons de azul, os resíduos azuis escuros representam um alto grau de conservação, enquanto os resíduos médios e não conservados estão representados em azul claro e branco, respectivamente. s1A= Loxtox s1A; s11A= Loxtox s11A.

5.2 Expressão e purificação das toxinas recombinantes

As toxinas recombinantes foram denominadas recLoxtox s1A e recLoxtox s11A e foram expressas em grandes quantidades respectivamente nas linhagens *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* Origami 2 (DE3) como proteínas fusionadas a uma His-tag na região N-terminal (**FIGURAS 10 A,B**). A recLoxtox s1A foi expressa na forma solúvel e mostrou uma banda abaixo de 37 kDa em SDS-PAGE (**FIGURAS 10 A**). Já a recLoxtox s11A foi expressa na forma insolúvel e foi solubilizada por incubação com uréia 6M (**FIGURA 10 B**). A ureia foi gradualmente removida durante a purificação da recLoxtox s11A e a proteína solúvel mostrou uma banda em torno de 37 kDa em SDS-PAGE (**FIGURA 10 B**). As diferenças entre a massa molecular deduzida e as massas observadas por SDS-PAGE resultaram dos resíduos adicionais de histidina e da sequência pelB.

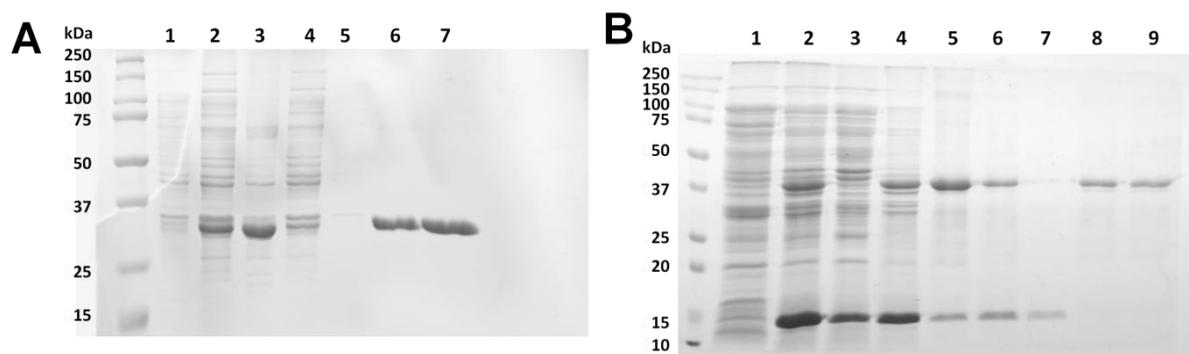


FIGURA 10 Expressão e purificação de toxinas recombinantes analisadas usando SDS-PAGE 12% sob condições redutoras. **A)** Expressão e purificação de recLoxtox s1A (s1A). 1: Controle de indução negativa de *E. coli* BL21 DE3. 2: Perfil proteico após indução com IPTG. 3 e 4: Sobrenadante e pellet obtidos depois da lise celular. 5: Sobrenadante obtido antes da eluição da recLoxtox s1A. 6 e 7: recLoxtox s1A purificada e dessalinizada. **B)** Expressão e purificação de recLoxtox s11A (s11A). 1: Controle de indução negativa de *E. coli* Origami 2 DE3. 2 e 3: Proteínas celulares recuperadas no pellet após indução com IPTG e lise celular. 4: Proteínas celulares obtidas após lise celular com Uréia 6M. 5 e 6: Sobrenadante e pellet obtidos após adição de Uréia 6M. 7: Sobrenadante obtido antes da eluição da recLoxtox s11A. 8: Sobrenadante com *refolding* das proteínas solubilizadas com uréia 6M. 9: Proteínas recLoxtox s11A solúveis e purificada sem uréia 6M.

5.3 Atividade esfingomielinásica das toxinas recombinantes

As proteínas recLoxtox s1A e recLoxtox s11A mostraram atividade esfingomielinásica significativamente menor comparado ao veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em condições de pH ácido (**FIGURA 11**). Em pH fisiológico (7,4), a recLoxtox s1A apresentou maior atividade esfingomielinásica e a recLoxtox s11A mostrou menor atividade contra esfingomielina. Ambas as proteínas recombinantes mostraram altos níveis de atividade contra esfingomielina em pH 8 e nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**FIGURA 11**).

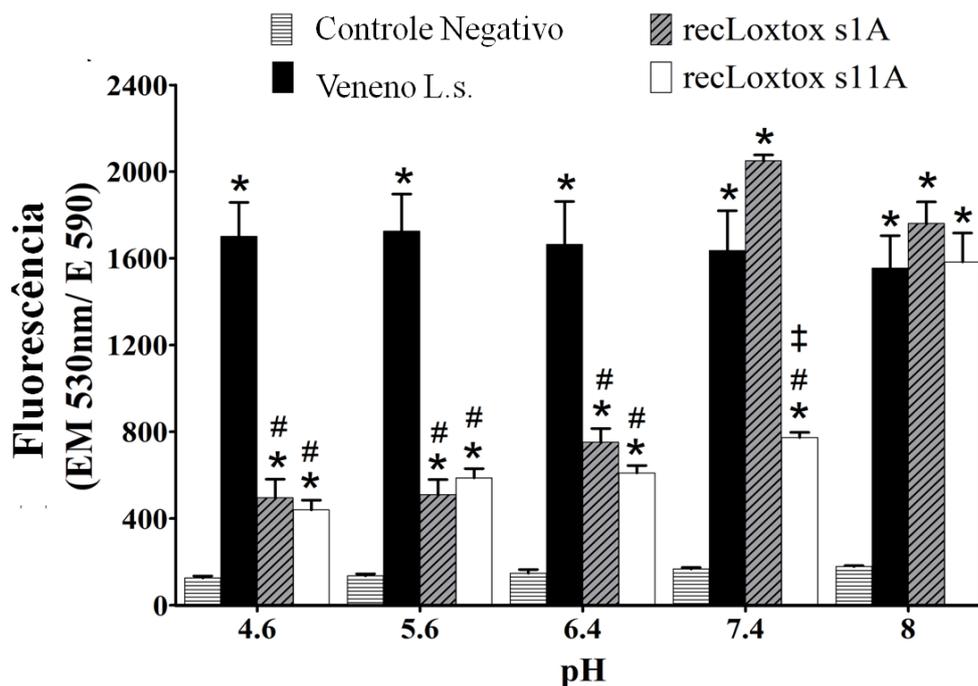


FIGURA 11 Atividade enzimática das toxinas recombinantes recLoxtox s1A (10 µg) e recLoxtox s11A (10 µg) sob diferentes condições de pH. O veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (10 µg) e o PBS foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Os resultados estão representados como média ± S.E.M. de cinco repetições. Diferenças significativas entre os grupos e o controle negativo são mostradas como * ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas entre as toxinas recombinantes e o controle positivo são mostradas como # ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas entre recLoxtox s1A e recLoxtox s11A estão representadas como ‡ ($p \leq 0,005$). Veneno L.s.= Veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898).

5.4 Efeitos in vivo das toxinas recombinantes

Foi avaliado o potencial de recLoxtox s1A (20 µg) e recLoxtox s11A (20 µg) de causar alterações na pele de coelhos (**FIGURA 12**). Os efeitos promovidos pelas toxinas recombinantes foram comparados com o veneno total (3 µg) nos mesmos animais. Sabe-se que o veneno é capaz de promover lesões com espalhamento gravitacional da lesão, principalmente devido aos efeitos das hialuronidases (Ferrer et al., 2013; Chatzaki et al., 2012). Assim, como os efeitos das toxinas recombinantes e do veneno foram avaliados no mesmo animal e para evitar que as

lesões se sobrepusessem, foram injetados 10 µg do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em outro animal, no qual foi observado o espalhamento gravitacional da lesão por uma região de 40 mm de diâmetro na região interescapular do animal em 4, 24 e 48 horas após a injeção do veneno (**Anexo 1 FIGURA A 1; FIGURA 11 C**). Além disso, baseado em observações prévias, 3 µg de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) foi suficiente para promover alterações histopatológicas em pele de coelho. Portanto foi utilizada a dose mínimas de 3 µg de veneno (Chatzaki et al., 2012). Dado a falta de espalhamento gravitacional devido a injeção das proteínas recombinantes separadas foram injetados 20 µg de cada toxina, uma quantidade suficiente para observar alterações macroscópicas e histopatológicas.

Macroscopicamente, todos os animais injetados com recLoxtox s1A ($n = 4$) apresentaram edema e necrose ulcerativa com aumento dos diâmetros das lesões formadas gradualmente ao longo do tempo (**FIGURAS 12 A, B**). Reações semelhantes foram observadas após a injeção de 3 µg do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) nos mesmos animais. Por outro lado, a injeção de recLoxtox s11A na pele de coelho ($n = 4$) levou a um pequeno edema e eritema, e ocorreu a diminuição nos diâmetros das lesões ao longo do tempo (**FIGURAS 12 A, B**). A pele injetada com PBS (controle negativo) não mostrou lesões (**FIGURA 12 A**).

Análises histológicas da pele de coelho expostas a recLoxtox s1A mostraram um aumento da resposta inflamatória ao longo do tempo (de 4 a 48 horas), semelhante à resposta inflamatória promovida pelo veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**FIGURAS 13, 14**). Em contraste, a injeção de recLoxtox s11A mostrou uma resposta inflamatória alta significativa em 4 horas em relação ao veneno e recLoxtox s1A, porém o infiltrado inflamatório provocado pela recLoxtox s11A diminuiu em 24 h e 48 h (**FIGURA 14**). A análise histológica também mostrou angiectasia, hiperemia, dissociação de fibras em todas as camadas dérmicas (edema), bem como infiltrado inflamatório multifocal composto principalmente por neutrófilos e alguns linfócitos em todos os animais e todos os intervalos de tempo após a injeção das toxinas recombinantes (**FIGURAS 15 G, H, K, L, O, P, S, T**) ou do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**FIGURAS 15 F, J, N, R**). Nos grupos injetados com toxinas e veneno também foi observado necrose dos folículos capilares após 4 h e formação de trombo semi ocluso as 24 h e 48 h (**FIGURAS 15 B-D**). As injeções de toxinas recombinantes e veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) também promoveram

formação de trombo semi-ocludente às 24 h e 48 h (**FIGURAS 15 J-L, N, O**). Observou-se também hemorragia e necrose das fibras musculares após a injeção de recLoxtox s1A às 4 h e 48h (**FIGURAS 15 G, S**) e do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**FIGURAS 15 F, R**). Não foi observada necrose da camada muscular após a injeção de recLoxtox s11A (**FIGURA 15 T**). Foi observada uma inflamação leve e ausência de alterações histológicas significativas nas regiões de controle negativo injetadas com PBS (**FIGURAS 13, 15 A, E, I, M, Q**).

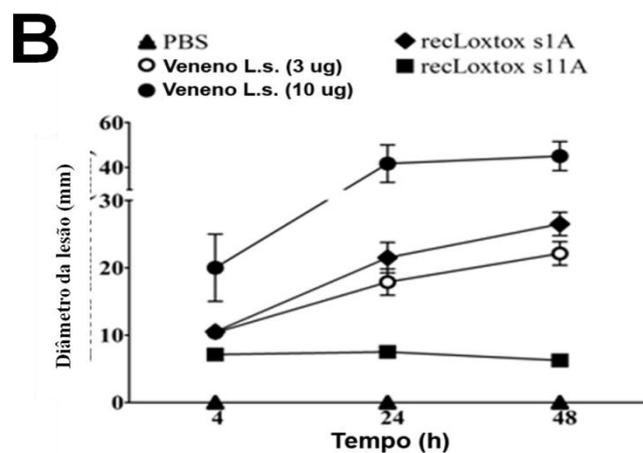
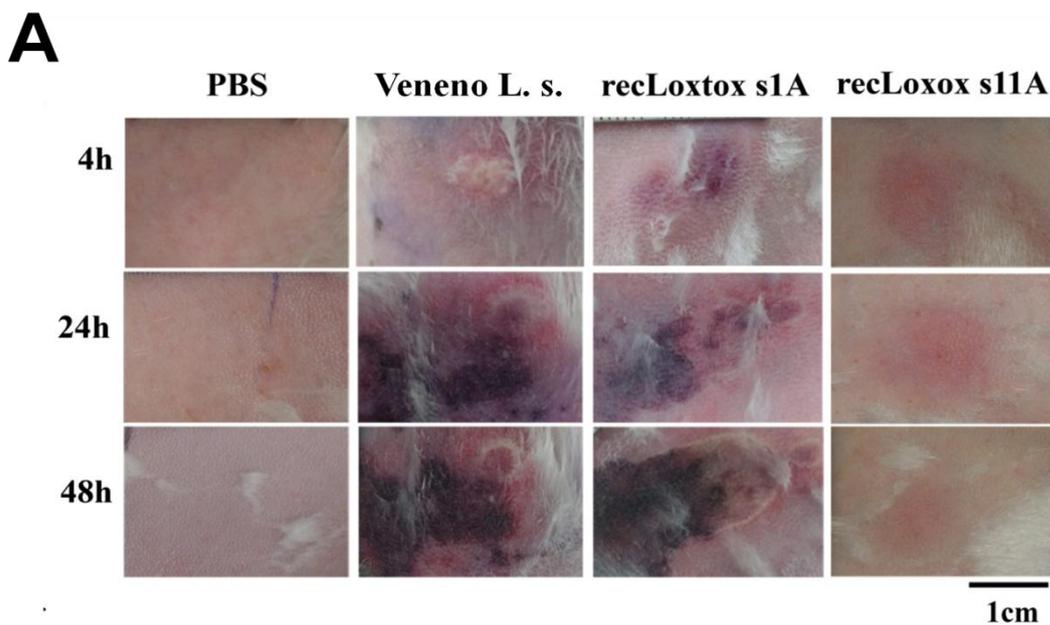


FIGURA 12 Caracterização da atividade macroscópica das toxinas recombinantes. **A)** Lesões cutâneas representativas promovidas pela recLoxtox s1A (20 µg, n = 4) ou recLoxtox s11A (20 µg, n = 4) nas 4, 24 e 48 horas após a injeção. Veneno de *L. similis* (3 µg) e PBS (100 µl) foram injetados como controle positivo e negativo para alterações cutâneas nos mesmos animais. **B)** Progressão das lesões (dermonecrose e edema) na pele de coelho (n = 8) após injeções das toxinas recombinantes (20 µg) ou veneno de *L. similis* (3 µg e 10 µg). Os resultados estão expressos como média ± SEM.

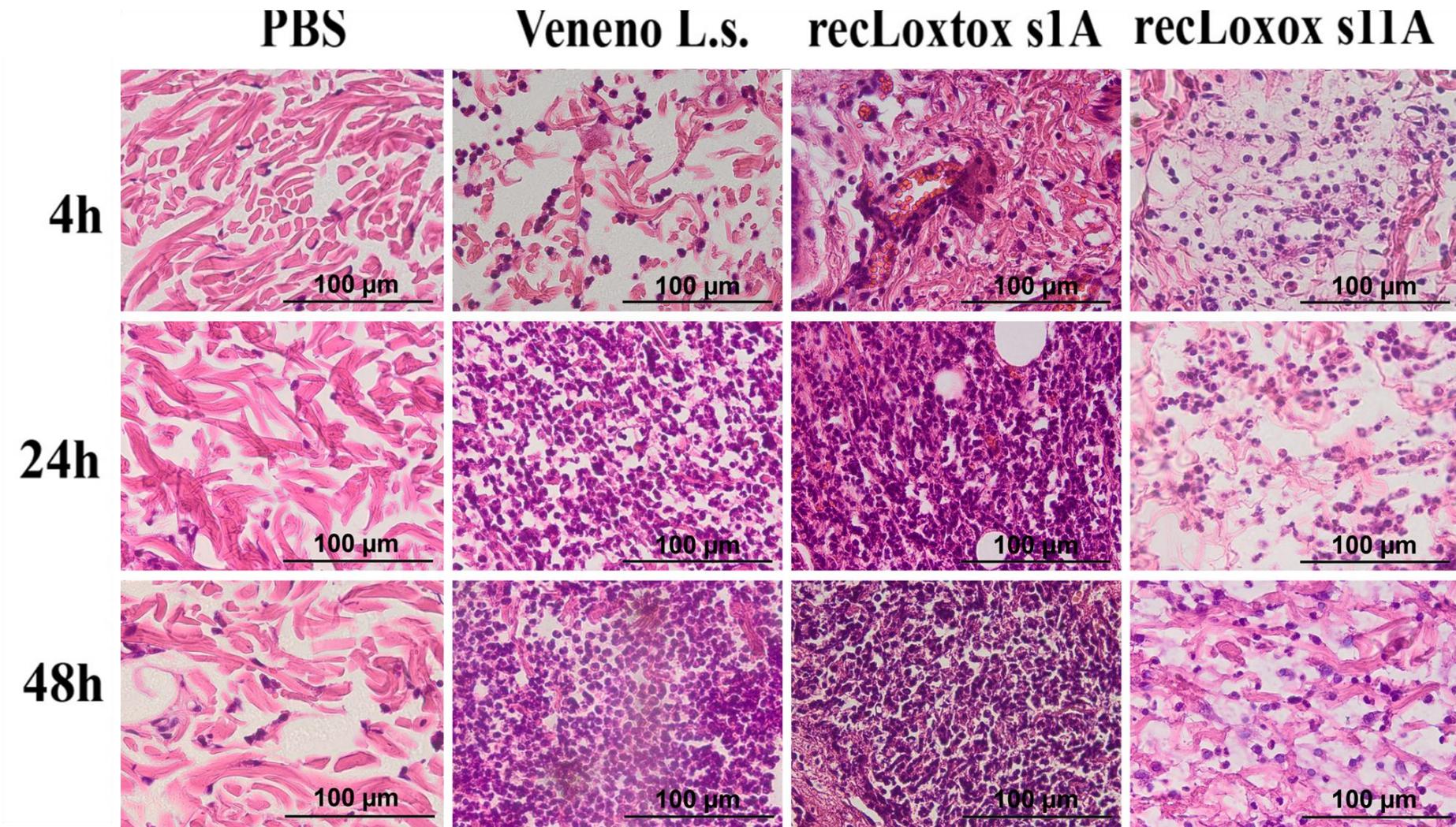


FIGURA 13 Caracterização da atividade histopatológica das toxinas recombinantes. As seções histológicas representativas foram coradas com hemetoxilina-eosina.

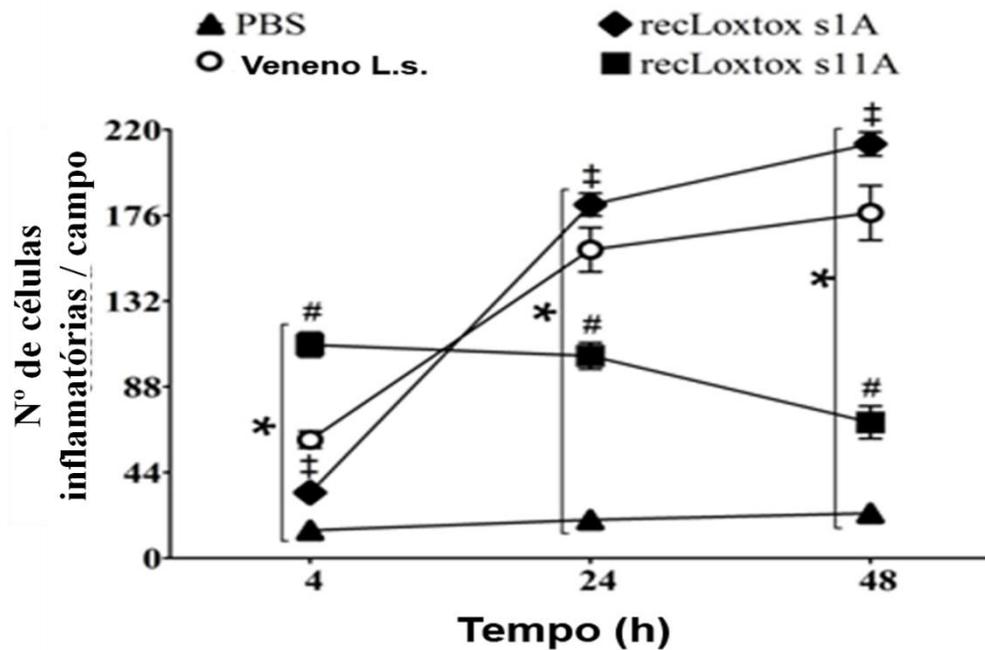
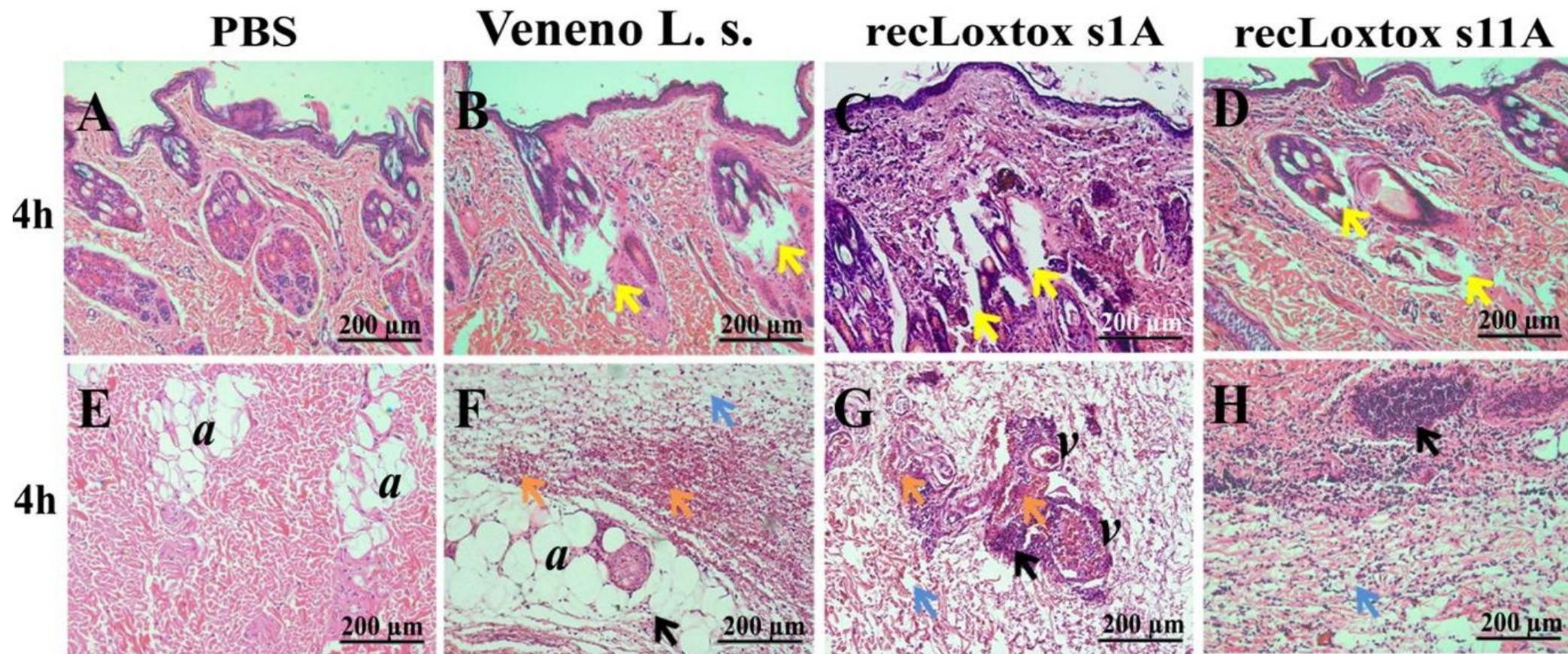


FIGURA 14 Análise morfométrica do infiltrado inflamatório. Análise quantitativa do infiltrado inflamatório às 4, 24 e 48 horas após a exposição a toxinas recombinantes (20 µg), veneno de *L. similis* (3 µg) ou PBS (100 µl). Diferenças significativas entre os grupos tratados e controle negativo (PBS) estão representadas como * ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas entre o grupo recLoxtox s1A e o veneno de *L. similis* são mostradas como # ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas entre recLoxtox s1A e recLoxtox s11A são mostradas como ‡ ($p \leq 0,05$). Os dados são expressos como média da contagem de células em 35 campos \pm S.E.M ($n = 8$ animais). Veneno L.s. = Veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898).



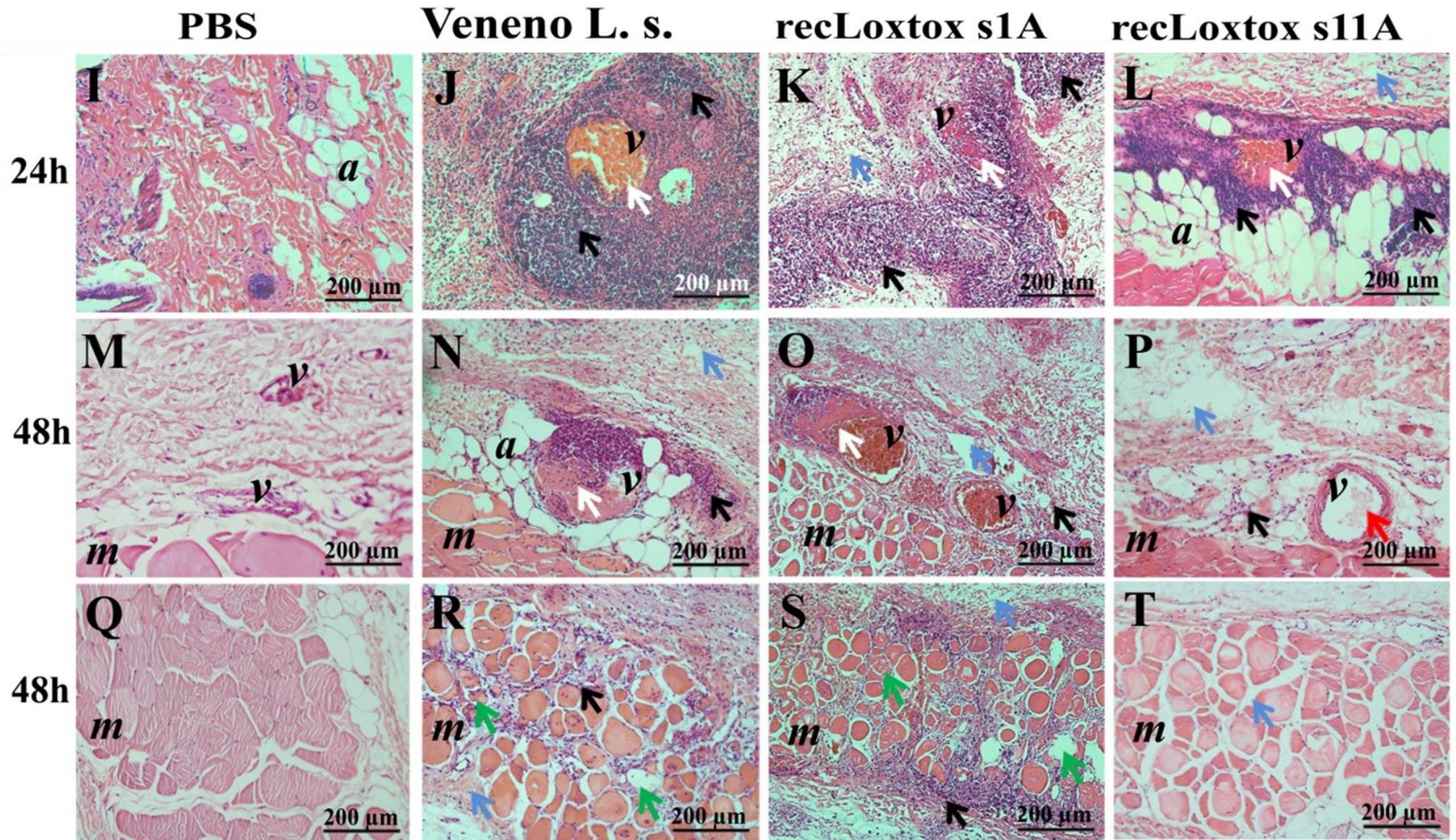


FIGURA 15 Análises histológicas das lesões após exposição a toxinas recombinantes e veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (coloração com hematoxilina-eosina). **A, E)** Controle negativo mostrando folículos capilares normais 4 horas após a injeção de PBS. **B- D)** Necrose dos folículos capilares (setas amarelas) causada pelo veneno de *L. similis* e as toxinas recombinantes às 4 h. **F-H)** Dissociação/edema de fibras e células (setas azuis), infiltrado inflamatório (setas pretas) e hemorragia (setas laranjas) causadas pelo veneno de *L. similis* e a toxina recLoxtox s1A às 4 h. **I, M, Q)** Derme e vasos sanguíneos normais, bem como fibras musculares normais no grupo do controle negativo (PBS) após 24 e 48 h. **J-L, N-P)** Edema (setas azuis), infiltrado inflamatório (setas pretas), trombo semioclusivo (setas brancas) e deposição de fibrina no interior dos vasos sanguíneos (seta vermelha) causados pelo veneno de *L. similis* e as toxinas recombinantes às 24 e 48 h. **R, S)** Necrose muscular (seta verde), edema (setas azuis) e infiltrado inflamatório exacerbado (setas pretas) causados pelo veneno de *L. similis* e recLoxtox s1A. **T)** Edema nas fibras musculares (setas azuis) causado pela recLoxtox s11A às 48 h. *a* = Adipócitos. *m* = Músculo. *v* = vasos. Veneno *L. s.* = veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). As análises histológicas são representativas de oito animais/grupo.

5.3 Atividade imunogênica das toxinas recombinantes

5.3.1 ELISA

Foram obtidos três soros imunes (soro anti-recLoxtox s1A, soro anti-recLoxtox s11A e soro anti-recLoxtox s1A/s11A) após diferentes protocolos de imunização. As titulações de soros imunes contra as toxinas recombinantes e contra o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) são mostradas na **Figura 16**. Todos os soros imunes produzidos neste trabalho e o soro antiveneno de *L. similis* produzido anteriormente por Chatzaki e colaboradores (2012) apresentaram forte reconhecimento cruzado contra os componentes do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**FIGURA 16 A**). No ELISA, a recLoxtox s1A e a recLoxtox s11A reagiram com seus soros específicos (anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s11A,

respectivamente) e com o soro anti-recLoxtox s1A/s11A (**FIGURAS 16 B, C**). A análise por ELISA também mostrou que a recLoxtox s1A apresentou alta reatividade com os soros anti-recLoxtox s11A e antiveneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**FIGURA 16 B**), enquanto que a recLoxtox s11A apresentou menor reação com os soros anti-recLoxtox s1A e antiveneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**FIGURA 16 C**).

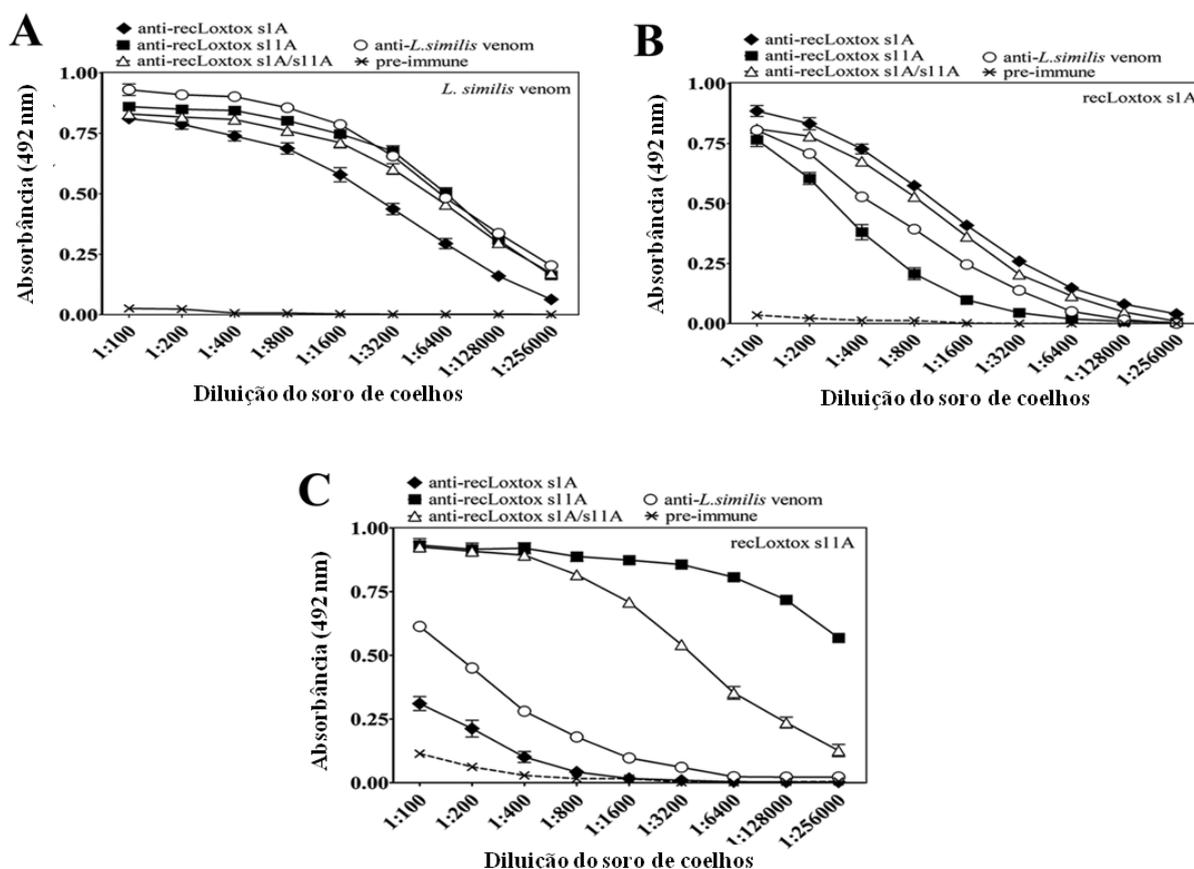


FIGURA 16 Resposta imunogênica das toxinas recombinantes. Valores de absorbância após reações de ELISA realizadas com 5 µg/ml de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**A**), recLoxtox s1A (**B**) ou recLoxtox s11A (**C**) imobilizados em placas de microtitulação, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados estão representados como média ± S.E.M.

5.3.2 Imunoensaios de SPOT

Dois conjuntos de peptídeos ligados à membrana (peptídeos de 15 aminoácidos, sobrepostos por cinco resíduos) correspondentes às sequências de aminoácidos de recLoxtox s1A (58 peptídeos) e recLoxtox s11A (65 peptídeos) foram preparados pela técnica de síntese Spot. As membranas foram expostas a cada soro imune de coelho produzido neste trabalho (soro anti-recLoxtox s1A, soro anti-recLoxtox s11A, soro anti-recLoxtox s1A/s11A) e ao soro antiveneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). O soro pré-imune foi utilizado como controle negativo para a intensidade do Spot analisado no software Image J. Um gráfico de análise de SPOT foi gerado para cada membrana analisada pelo programa Image J (**FIGURAS 17 A, 18 A**) e o valor de 15% de reatividade foram considerados como valor mínimo de intensidade de reação com cada soro imune. Os epítomos com intensidades de reação positiva foram destacados nas membranas de SPOT de cada toxina recombinante (**FIGURAS 17 B, 18 B**).

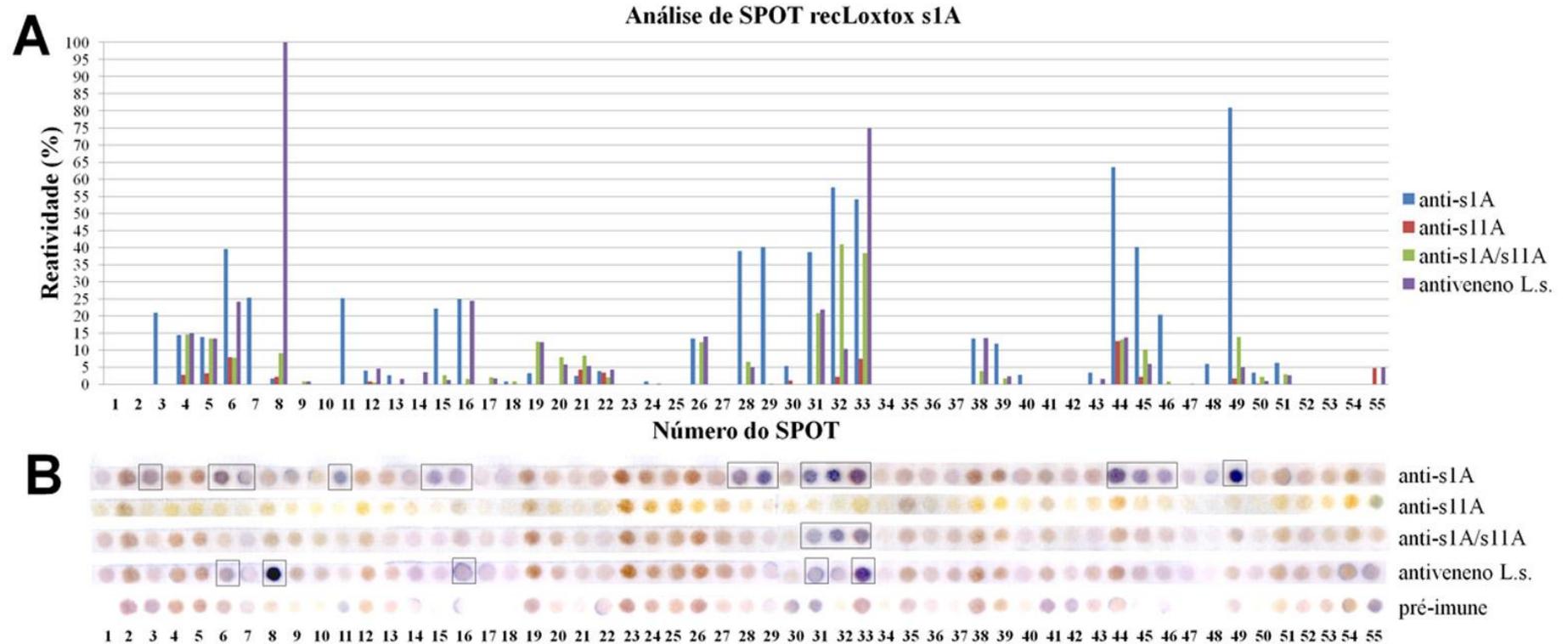


FIGURA 17 Análise de SPOT dos epítomos da recLoxtox s1A. **A)** Gráfico de intensidade da reatividade dos soros anti-recLoxtox recombinantes e antiveneno de *L. similis* com os Spots. A intensidade foi calculada utilizando o programa ImageJ e o valor da intensidade dos epítomos expostos ao soro pré-imune foi deduzido. A reatividade mínima considerada na análise foi de 15%. **B)** Membrana de epítomos da recLoxtox s1A após exposição aos soros anti-recLoxtox s1A, anti-recLoxtox s11A, anti-recLoxtox s1A/s11A e antiveneno de *L. similis*. Os epítomos cuja reatividade foi igual ou superior a 15% estão destacados.

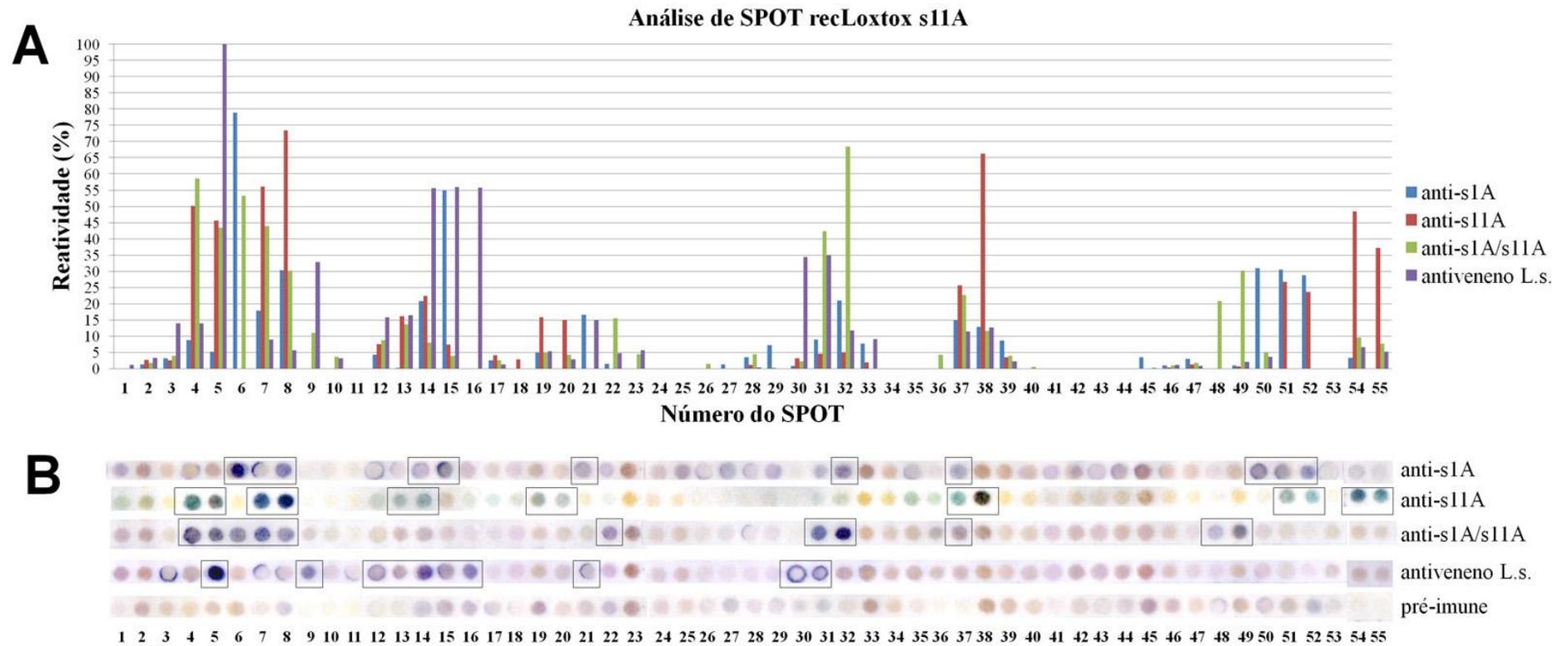


FIGURA 18 Análise de SPOT dos epítomos da recLoxtox s11A. **A)** Gráfico de intensidade da reatividade dos soros anti-recLoxtox recombinantes e antiveneno de *L. similis* com os Spots. A intensidade foi calculada utilizando o programa ImageJ e o valor da intensidade dos epítomos expostos ao soro pré-imune foi deduzido. A reatividade mínima considerada na análise foi de 15%. **B)** Membrana de epítomos da recLoxtox s11A após exposição aos soros anti-recLoxtox s1A, anti-recLoxtox s11A, anti-recLoxtox s1A/s11A e antiveneno de *L. similis*. Os epítomos cuja reatividade foi igual ou superior a 15% estão destacados.

Os soros anti-recLoxtox s1A, anti-recLoxtox s1A/s11A e antiveneno de *L. similis* reagiram com os peptídeos ligados às membranas das toxinas recombinantes, reconhecendo diferentes regiões antigênicas (**FIGURAS 19 A, B**). Em contraste, nenhuma resposta imuno foi observada para os peptídeos de recLoxtox s1A incubados com o soro anti-recLoxtox s11A (**FIGURA 19 A**). Apesar das diferenças, foram distinguidas algumas regiões antigênicas entre os peptídeos de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A, as quais compartilham alguns resíduos, incluindo regiões que possuem resíduos importantes para a atividade catalítica: resíduos H¹⁶, E³⁶, D³⁸, H⁵², D⁵⁷, Y²²⁷, W²²⁹, D²³², N²⁵¹ na recLoxtox s1A e resíduos E³⁶, D³⁸, H⁵², D⁵⁷, C⁵⁸, C⁶², D⁹⁶, K⁹⁸, C²⁰¹, N²⁵² na recLoxtox s11A (**FIGURAS 19 A, B**).

Além disso, similar ao resultado obtido pelo ensaio de Spot, nos ensaios de *western blotting* não foram observadas reações imunogênicas da sequência de recLoxtox s1A após incubação com o soro anti-recLoxtox s11A (**Anexo 2 FIGURA A 2**). O teste de *western blotting* também mostrou que todos os soros imunes reconheceram uma fração com peso menor do que 37 kDa, que corresponde à massa molecular de fosfolipases D (Loxtox) no veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (**Anexo 2 FIGURA A 2**). Além disso, na análise foi observado que recLoxtox s1A e recLoxtox s11A reagiram com seus soros específicos (anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s11A, respectivamente), com soro anti-recLoxtox s1A/s11A e reagiram com o soro antiveneno de *L. similis* (**Anexo 2 FIGURA A 2**).

A

SPOT	recLoxtox s1A	anti-s1A	anti-s11A	anti-s1A/s11A	anti-L.s.
1	VGERADKRRPIWIMG				
2	DKRRPIWIMGH ¹⁶ MVNS				
3	IWIMGH ¹⁶ MVNSLAQID	+			
4	H ¹⁶ MVNSLAQIDFVNL				
5	LAQIDFVNLGSNSI				
6	EFVNLGSNSIE ³⁶ TD ³⁸ VS	++			+
7	GSNSIE ³⁶ TD ³⁸ VSFDKQA	+			
8	E ³⁶ TD ³⁸ VSFDKQANPEYT				++++
9	FDKQANPEYTYH ⁵² GIP				
10	NPEYTYH ⁵² GIPC ⁵⁶ D ⁵⁷ C ⁵⁸ GR				
11	YH ⁵² GIPC ⁵⁶ D ⁵⁷ C ⁵⁸ GRSC ⁶² THS	+			
12	C ⁵⁶ D ⁵⁷ C ⁵⁸ GRSC ⁶² THSTNFND				
13	SC ⁶² THSTNFNDFLKGL				
14	TNFNDFLKGLRKATT				
15	FLKGLRKATTPGDSK	+			
16	RKATTPGDSKYHEKL	+			+
17	PGDSKYHEKLILVVF				
18	YHEKLILVVF ⁹⁶ LK ⁹⁸ TG				
19	ILVVF ⁹⁶ LK ⁹⁸ TGSLYDN				
20	D ⁹⁶ LK ⁹⁸ TGSLYDNQAYDA				
21	SLYDNQAYDAGTKLA				
22	QAYDAGTKLAKNLLQ				
23	GTKLAKNLLQHYWNN				
24	KNLLQHYWNNGNNGG				
25	HYWNNGNNGGRAYII				
26	GNNGRAYIILSIPN				
27	RAYIILSIPNLNHYK				
28	LSIPNLNHYKLITGF	++			
29	LNHYKLITGFKETLK	++			
30	LITGFKETLKNEGHE				
31	KETLKNEGHEELEK	++			+
32	NEGHEELEKVGHDF	++			+
33	ELEKVGHDFSGNDD	++			+++
34	VGHDFSGNDDISDVQ				
35	SGNDDISDVQKTYNK				
36	ISDVQKTYNKAGVTG				
37	KTYNKAGVTGHVWQS				
38	AGVTGHVWQSDGITN				
39	HVWQSDGITNC ²⁰¹ LLRG				
40	DGITNC ²⁰¹ LLRGLTRVK				
41	C ²⁰¹ LLRGLTRVKAAVAN				
42	LTRVKAAVANRDSGS				
43	AAVANRDSGSIINK				
44	RDSGSIINKVY ²²⁷ YW ²²⁹ T	+++			
45	GIINKVY ²²⁷ YW ²²⁹ TVD ²³² KRA	++			
46	VY ²²⁷ YW ²²⁹ TVD ²³² KRATTRDS	+			
47	VDKRATTRDSLDAKV				
48	TTRDSLDAKVDGVMT				
49	LDAKVDGVMT ²⁵¹ YPDV	++++			
50	DGVMT ²⁵¹ YPDVIDVVL				
51	N ²⁵¹ YPDVIDVVLNEDAY				
52	IVDVLNEDAYKNKFR				
53	NEDAYKNKFRVATYE				
54	KNKFRVATYEDNPWE				
55	VATYEDNPWFETKEH				

B

SPOT	recLoxtox s11A	anti-s1A	anti-s11A	anti-s1A/s11A	anti-L.s.
1	VVERADSRKPIWDIA				
2	SRKPIWDIAH ¹⁶ MVNDL				
3	WDIAH ¹⁶ MVNDLELVDE				
4	MVNDLELVDEYLDG		++	+++	
5	ELVDEYLDGANGLE ³⁶		++	++	++++
6	YLDGANGLE ³⁶ LD ³⁸ VDF	++++		++	
7	ANGL E ³⁶ LD ³⁸ VDFEKDGT	+	+++	++	
8	LD ³⁸ VDFEKDGTAKEMY	++	+++	++	
9	EKDGTAKEMYH ⁵² GVPC				++
10	AKEMYH ⁵² GVPC ⁵⁶ D ⁵⁷ C ⁵⁸ FRS				
11	H ⁵² GVPC ⁵⁶ D ⁵⁷ C ⁵⁸ FRSC ⁶² TRSE				
12	D ⁵⁷ C ⁵⁸ FRSC ⁶² TRSEEFTKY				+
13	C ⁶² TRSEEFTKYMDYIR		+		+
14	EFTKYMDYIRQLTTP	+	+		++
15	MDYIRQLTTPGNPKF	++			++
16	QLTTPGNPKFRSOLI				++
17	GNPKFRSOLIMLIMD ⁹⁶				
18	RSOLIMLIMD ⁹⁶ LK ⁹⁸ LKG				
19	MLIM D ⁹⁶ LK ⁹⁸ LKGIEPNV		+		
20	LK ⁹⁸ LKGIEPNVAYAAG		+		
21	IEPNVAYAAGKSVAE	+			+
22	AYAAGKSVAEKLLSS			+	
23	KSVAEKLLSSYWQNG				
24	KLLSSYWQNGKSGAR				
25	YWQNGKSGARAYIVL				
26	KSGARAYIVLSLETI				
27	AYIVLSLETITRPDF				
28	SLETITRPDFIKGFR				
29	TRPDFIKGFRDAITA				
30	IKGFRDAITASGHEE				++
31	DAITASGHEELFEKI			++	++
32	SGHEELFEKIGWDFS	+		+++	
33	LFEKIGWDFSGNEDL				
34	GWDFSGNEDLGDIRR				
35	GNEDLGDIRRMYYQY				
36	GDIRRMYYQYGIEDH				
37	MYQYGIEDHIWQGD	+	+	+	
38	GIEDHIWQGDGITNC ²⁰¹		+++		
39	IWQGDGITNC ²⁰¹ ITRGD				
40	GITNC ²⁰¹ ITRGDYRLKE				
41	ITRGDYRLKEALKKK				
42	YRLKEALKKKNDPDY				
43	ALKKKNDPDYKYTLK				
44	NDPDYKYTLKVY ²²⁸ YW ²³⁰ S				
45	KYTLKVY ²²⁸ YW ²³⁰ SID ²³³ KNS				
46	VY ²²⁸ YW ²³⁰ SID ²³³ KNSSIRHA				
47	IDKNSSIRHALRLGV				
48	SIRHALRLGVDAIMT			+	
49	LRGVDAIMT ²⁵² YPED			++	
50	DAIMT ²⁵² YPEDVKSIL	++			
51	N ²⁵² YPEDVKSILQESEF	++	+		
52	VKSILQESEFSGSHR	+	+		
53	QESEFSGSHRMATYE				
54	SGSHRMATYEDYPWQ			++	
55	MATYEDYPWQLEHH			++	

Reatividade dos soros: + | 15% - 30% | ++ | 30% - 55% | +++ | 55% - 75% | ++++ | 75% - 100%

FIGURA 19 Peptídeos imunogênicos das toxinas recombinantes. Sequências peptídicas de 15 resíduos de recLoxtox s1A (**A**) e recLoxtox s11A (**B**) foram ligadas a membranas com sobreposições de 5 resíduos. As sequências dos Spots mais retivos estão indicadas em cinza. Os resíduos do sítio ativo são destacados em negrito com suas respectivas numerações. Os últimos peptídeos contêm histidinas (sublinhadas) usadas na construção das recombinantes.

5.4 Modelagem molecular

Modelos de homologia 3D foram construídos para a recLoxtox s1A e a recLoxtox s11A com base em estruturas de cristalografia de raios-X da LiRecDT1 de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (PDB: 3RLH) e da StSicTox_βB1i de *Sicarius terrosus* (Nicolet, 1849)(PDB: 4QA6X) usando o software SWISS-MODEL (**FIGURAS 20 A, B**). Ambas as isoformas mostraram uma estrutura de TIM-barril ((α/β)₈) contendo os resíduos do sítio ativo (representados em verde) e cisteínas que se ligam em duas pontes dissulfeto (representadas em amarelo). Os modelos foram validados através do gráfico de Ramachandran do *software* SWISS-MODEL, o qual mostrou que os modelos gerados para a recLoxtox s1A e recLoxtox s11A apresentavam 98% e 95% dos resíduos em regiões favoráveis. Além disso, a função de pontuação QMEAN gerada pelo *software* SWISS-MODEL foi utilizada para avaliação da qualidade dos modelos gerados e o QMEAN global obtido foi de 0,91 ± 0,05 para o modelo da recLoxtox s1A e 0,87 ± 0,05 para o modelo da recLoxtox s11A (**Anexo 3 FIGURA A 3, Anexo 4 FIGURA A 4**). Os epítomos encontrados nos imunoenaios de Spot foram localizados nos modelos 3D na superfície das estruturas de toxinas recombinantes. Diferentes resíduos do sítio ativo das enzimas foram reconhecidos pelos soros imunes (destacados em negrito; **FIGURAS 20 A, B**).

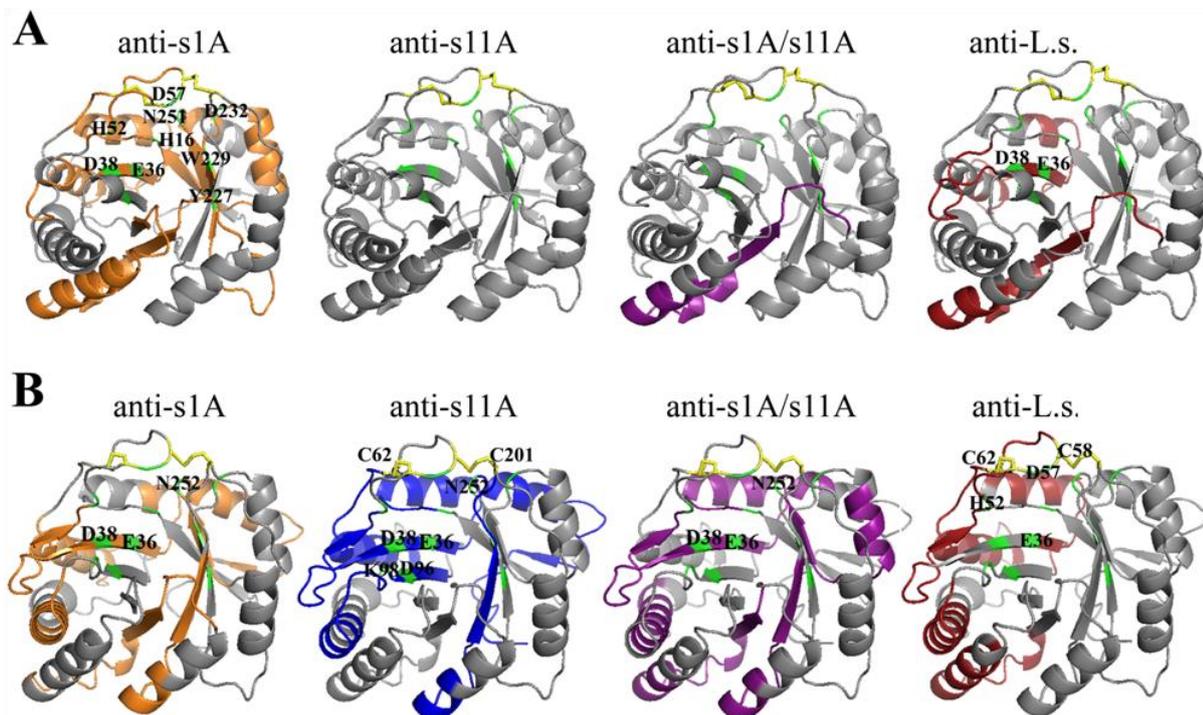


FIGURA 20 Modelagem molecular e mapeamento de epítomos das toxinas recombinantes. Modelos de homologia do recLoxtox s1A (**A**) e recLoxtox s11A (**B**) foram realizados no servidor SWISS-MODEL. Os peptídeos reconhecidos nas membranas de Spot por cada soro imune estão representados em laranja (soro anti-recLoxtox s1A), azul (soro anti-recLoxtox s11A), roxo (soro anti-recLoxtox s11A) e vermelho (soro antiveneno de *L. similis*). Em cinza estão as regiões não reconhecidas pelos respectivos soros. Os aminoácidos do sítio ativo estão destacados em verde e os resíduos reconhecidos são representados por letras e seus respectivos números. As cisteínas estão representadas em amarelo. anti-s1A = soro anti-recLoxtox s1A; anti-s11A= soro anti-recLoxtox s11A; anti-s1A/s11A = soro anti-recLoxtox s1A/s11A; anti-L.s.= soro antiveneno de *L. similis*.

5.5 Neutralização dos efeitos do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898)

5.5.1 Neutralização *in vitro*

O potencial dos soros imunes obtidos neste estudo para neutralizar a atividade esfingomielinásica *in vitro* e os efeitos *in vivo* do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) foram analisados. O veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) incubado na ausência de soro exibiu alta atividade esfingomielinásica e foi considerado como 100% de atividade (**FIGURA 21**). Os soros imunes anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s1A/s11A diluídos 1:10 reduziram a atividade do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em cerca de 90%, enquanto o soro anti-recLoxtox s11A neutralizou a atividade enzimática do veneno em 80%. Além disso, os soros anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s1A/s11A diluídos 1:10.000 foram capazes de neutralizar a atividade enzimática do veneno em aproximadamente 60%, enquanto que o soro anti-recLoxtox s11A mostrou uma capacidade de neutralização de aproximadamente 40% na mesma diluição (**FIGURA 21**). Não foram observadas alterações significativas da atividade esfingomielinásica após a incubação do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) com soro pré-imune diluído 1:10 (**FIGURA 21**).

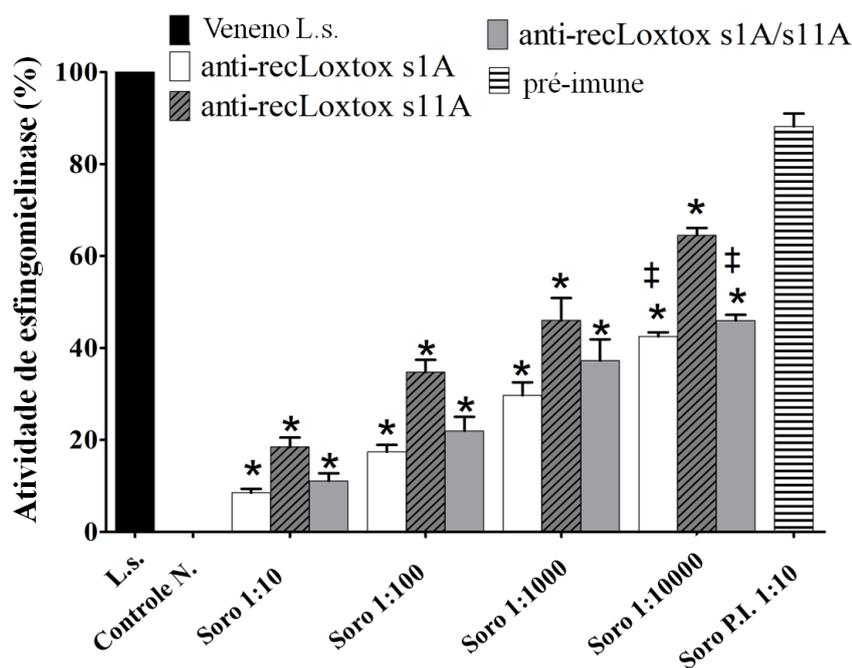


FIGURA 21 Neutralização da atividade de esfingomielinase do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). O veneno de *L. similis* (3 μ g) foi pré-incubado com os soros imunes. O veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (3 μ g) sem soro foi estabelecido como 100% de atividade de esfingomielinase (controle positivo). *L. similis* (3 μ g) pré-incubado com soro pré-imune (diluído 1:10) foi usado como controle negativo de neutralização. PBS sem o veneno de *L. similis* foi usado como controle negativo da reação (Controle N.). Os resultados estão representados como média \pm S.E.M. de cinco repetições. Diferenças significativas entre os grupos do veneno pré-incubado com soros imune e pré-imune em relação ao controle positivo estão representadas como * ($p \leq 0,05$). As diferenças significativas entre os soros anti-recLoxtox s1A ou anti-recLoxtox s1A/s11A e o soro anti-recLoxtox s11A estão representadas como ‡ ($p \leq 0,05$). Veneno L.s. e L.s. = veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898); Soro P.I. = Soro pré-imune.

5.5.1 Neutralização *in vivo*

A análise macroscópica do ensaio de neutralização *in vivo* mostrou que os soros anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s1A/s11A neutralizaram significativamente as lesões necróticas em todos os intervalos de tempo, contrastando com a intensa dermonecrose promovida pelo veneno pré-incubado com soro pré-imune (**FIGURAS 22 A, B**). Por outro lado, foi observada uma menor capacidade do soro anti-recLoxtox s11A de neutralizar a necrose (**FIGURAS 22 A, B**). Todos os soros imunes reduziram significativamente o edema provocado pelo veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em contraste com o soro pré-imune (**FIGURA 22 C**). O soro anti-recLoxtox s1A/s11A mostrou maior capacidade de neutralização do edema (**FIGURA 22 C**). Análises histológicas e morfométricas das lesões mostraram que a pré-incubação com os soros anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s1A/s11A reduziu a dissociação das fibras colágenas e a necrose da camada muscular e diminuiu o infiltrado inflamatório observado às 4 h, 24 h e 48 h (**FIGURAS 23, 24**). Em comparação, o soro anti-recLoxtox s11A reduziu a degradação das fibras e a resposta inflamatória principalmente às 4 h após a injeção, enquanto mostrou menor neutralização do infiltrado inflamatório às 48h (**FIGURAS 23, 24**).

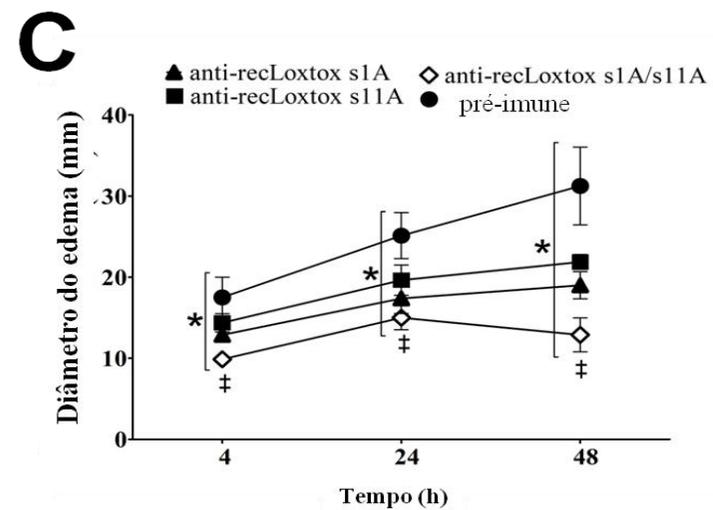
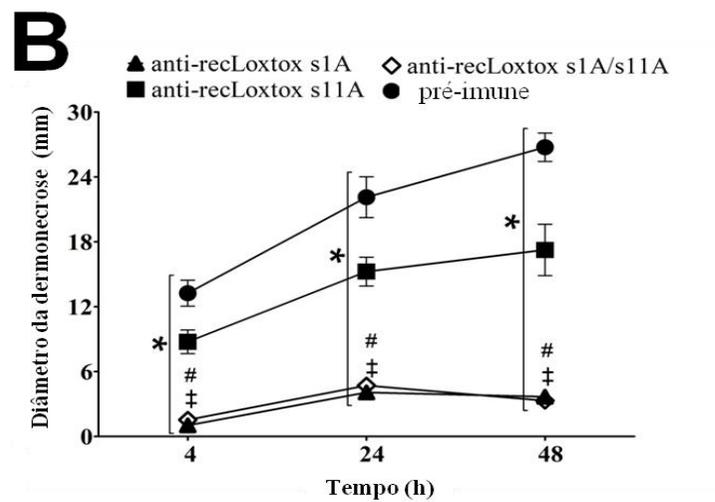
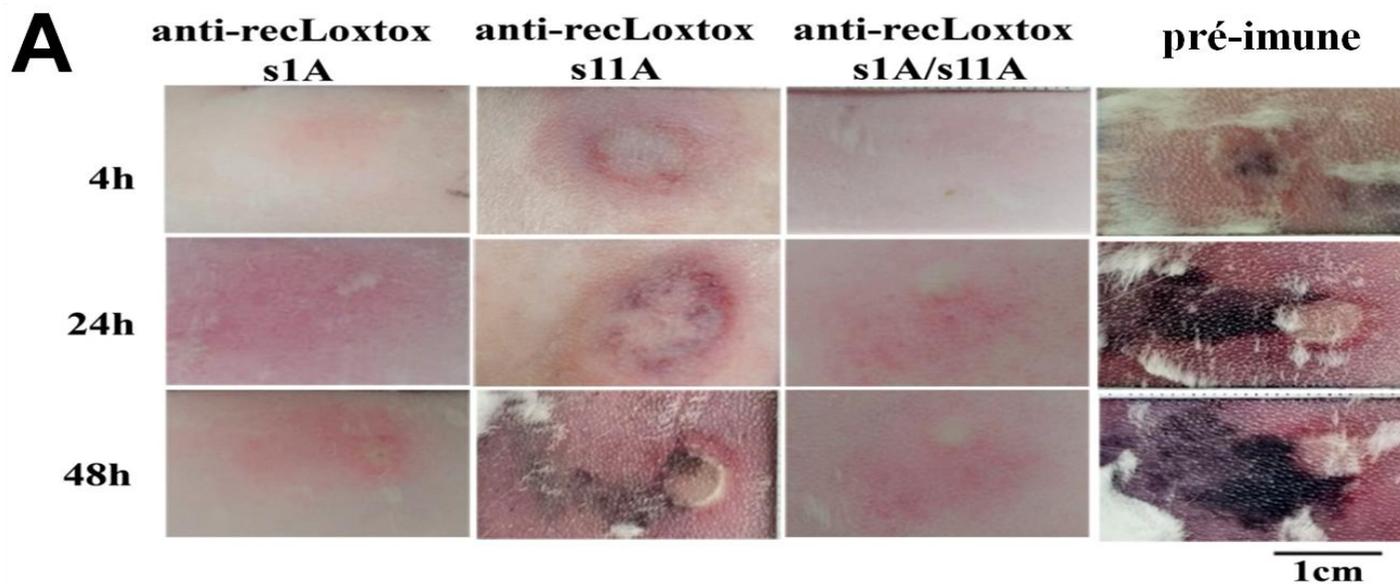
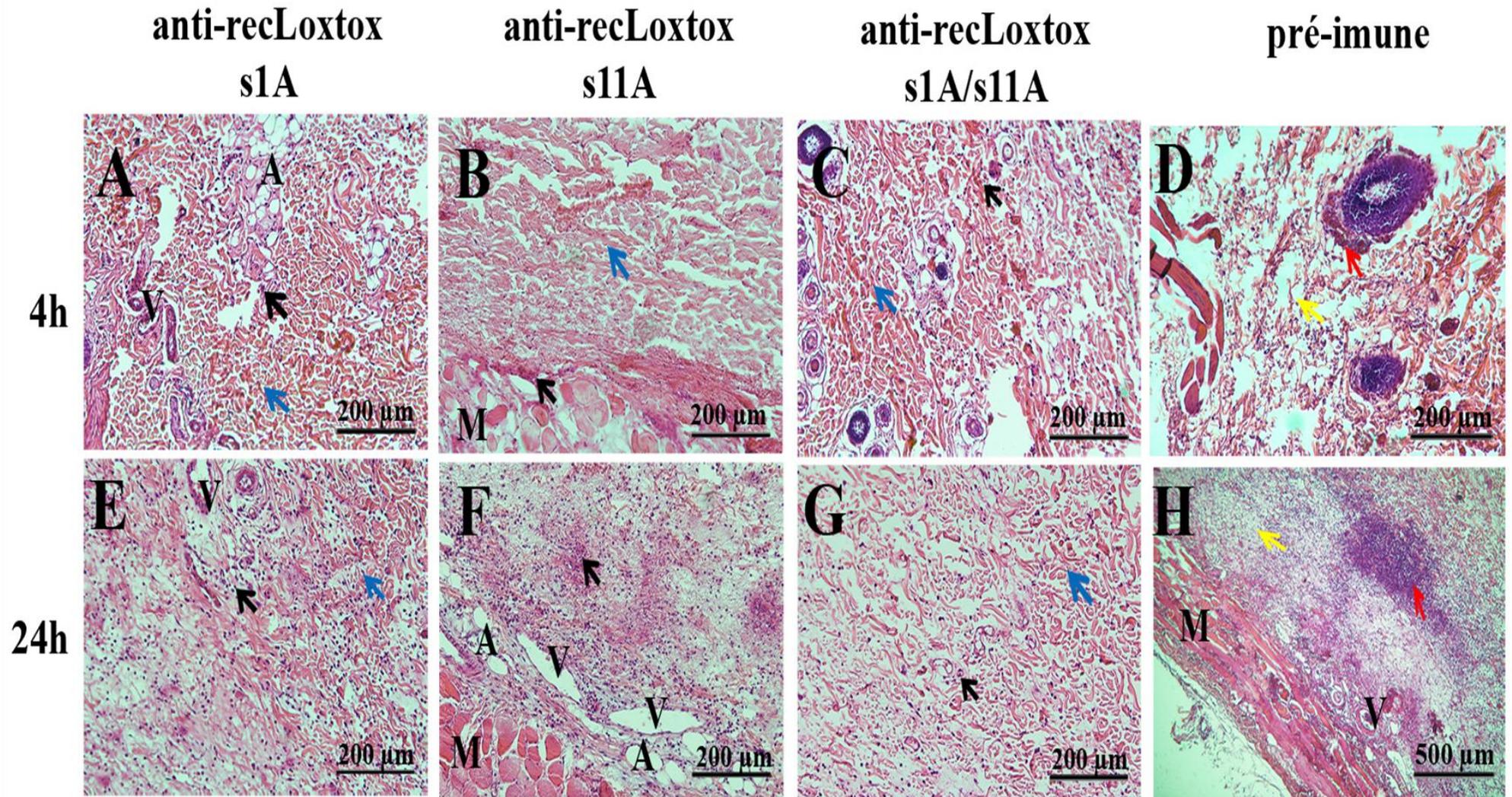


FIGURA 22 Neutralização *in vivo* da atividade do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). **A)** Propriedade dos soros imunes de neutralizar os efeitos promovidos pelo veneno de *L. similis* (3 µg) em pele de coelho ($n = 4$ / grupo) às 4, 24 e 48 h pós-injeção. Pré-incubação com soro pré-imune foi usado como controle negativo. **B)** Inibição de lesões necróticas **C)** Inibição de progressão de edema. Diferenças significativas entre os soros imunes e soro pré-imune são mostradas como * ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas entre o soro anti-recLoxtox s1A e soro anti-recLoxtox s11A são mostradas como # ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas entre o soro anti-recLoxtox s11A e o soro anti-recLoxtox s1A/s11A são mostradas como ‡ ($p \leq 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm SEM.



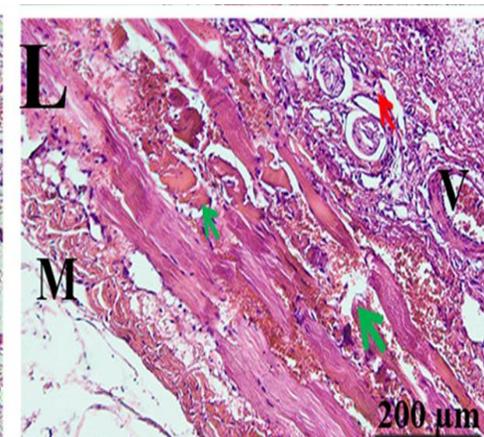
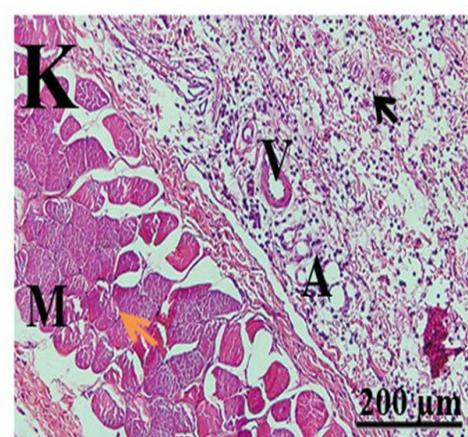
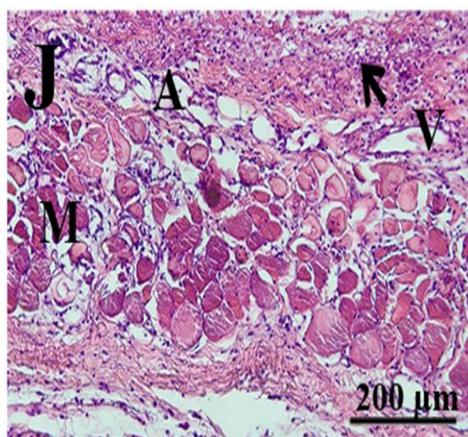
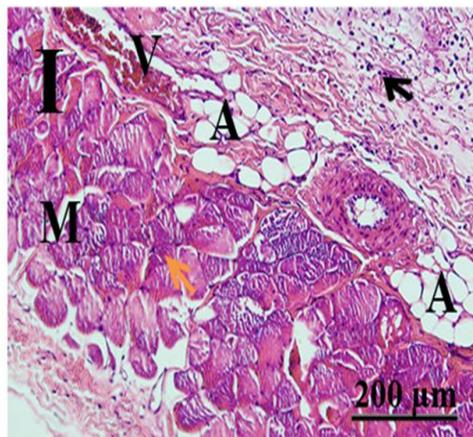
anti-recLoxtox
s1A

anti-recLoxtox
s11A

anti-recLoxtox
s1A/s11A

pré-immune

24h



48h

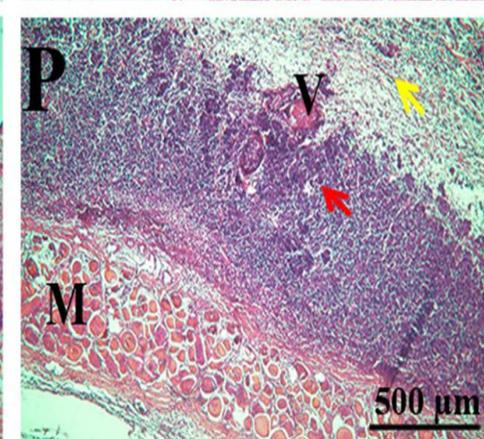
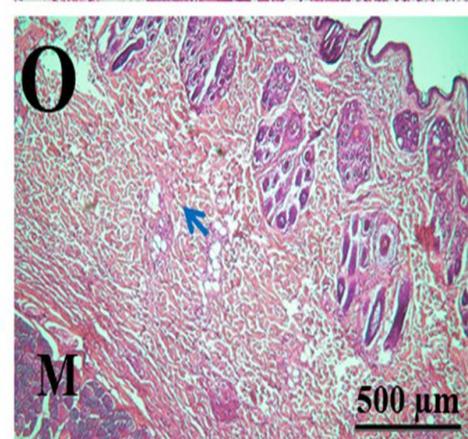
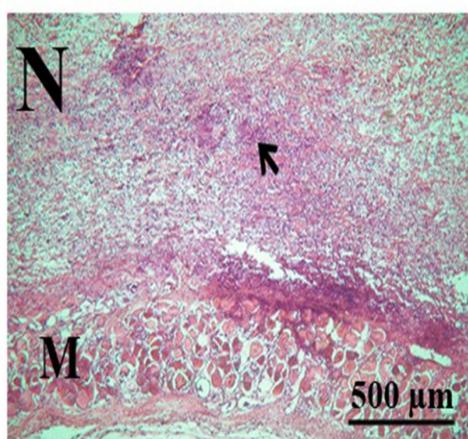
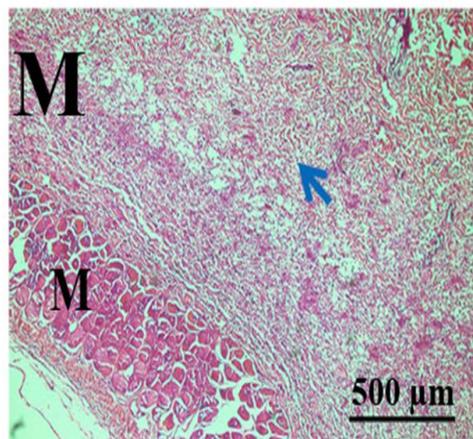


FIGURA 23 Análises histológicas da proteção *in vivo* induzida por soros imunes. O veneno de *L. similis* (3 µg) foi pré-incubado com os soros imunes (coloração em hematoxilina-eosina). **A-C)** A pré-incubação com soros imunes minimizou a dissociação das fibras de colágeno (setas azuis) e a resposta inflamatória (setas pretas) após 4 horas. **E, G, I, K, M)** Pré-incubação com os soros anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s1A/s11A diminuiu o infiltrado inflamatório (setas pretas), reduziu a necrose das fibras colágenas e das fibras musculares (setas azuis e laranja, respectivamente) as 24 e 48 h. **F, J, N)** Diminuição do infiltrado inflamatório (setas pretas) após a pré-incubação com soro anti-recLoxtox s11A as 24 e 48 h. **D, H, L, P)** Intensa dissociação das fibras colágenas (setas amarelas), hemorragia e aumento do infiltrado inflamatório (setas vermelhas) e necrose das fibras musculares (setas verdes) às 4, 24 e 48 horas no grupo controle [pré-incubação do veneno de *L. similis* (3 µg) com soro pré-imune]. *a* = Adipócitos; *m* = Músculo; *v* = Vaso. As histologias são representativas de 3 grupos com n = 4 animais/grupo.

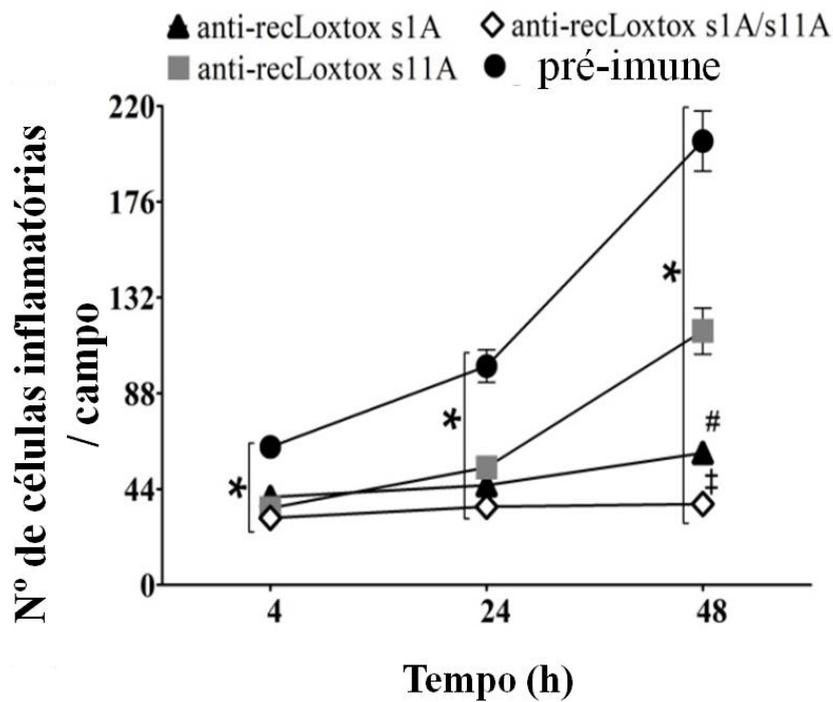


FIGURA 24 Neutralização *in vivo* do infiltrado inflamatório. Os dados são expressos como média \pm S.E.M da contagem de células em 35 campos de 3 grupos com $n = 4$ animais/grupo. Diferenças significativas entre as células inflamatórias após a incubação do veneno de *L. similis* com os soros imunes e soro pré-imune são representadas como * ($p \leq 0,05$). As diferenças significativas entre o soro anti-recLoxtox s1A e o soro anti-recLoxtox s11A estão representadas como # ($p \leq 0,05$). Diferenças significativas entre o soro anti-recLoxtox s11A e soro anti-recLoxtox s1A / s11A estão representadas como ‡ ($p \leq 0,05$).

6. Discussão

6.1. Comparações das sequências e caracterização funcional das toxinas recombinantes

Estudos anteriores demonstraram que o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) é capaz de promover efeitos histopatológicos e bioquímicos semelhantes aos observados para outras espécies de *Loxosceles* de importância médica (Silvestre et al., 2005; Chatzaki et al., 2012; Pereira et al., 2012a,b; Horta et al., 2013). A primeira análise transcriptômica da glândula de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) mostrou que as fosfolipases D ou proteínas Loxtox correspondem a 15% dos transcritos de toxinas (Dantas et al., 2016). Os grupos Loxtox s1 e Loxtox s11 foram verificados como os mais representativos, codificando 53,9% e 18,5% do Loxtox na glândula de veneno, respectivamente (Dantas et al., 2016). No entanto, ainda não foram realizados estudos dos efeitos isolados das toxinas Loxtox do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), incluindo expressão heteróloga, propriedades biológicas e imunológicas. Dessa forma, nesse trabalho foi descrita a clonagem, expressão e caracterização funcional de duas Loxtox da glândula de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), denominadas recLoxtox s1A (GenBank: KU891936) e recLoxtox s11A (GenBank: KU891960).

A massa molecular teórica (~ 32kDa) e os pontos isoelétricos (6 e 5,2) para as sequências maduras de aminoácidos deduzidas da Loxtox s1A e da Loxtox s11A foram semelhantes a de outras Loxtox descritas anteriormente (Kalapothakis et al., 2007). Ambas as toxinas recombinantes foram obtidas com sucesso através da expressão em *E. coli* e a análise SDS-PAGE mostrou que a recLoxtox s1A possui uma massa de 33.47 kDa, enquanto que a massa da recLoxtox s11A está em torno de 37kDa. Resíduos adicionais de histidinas na região N-terminal e a sequência sinal pelB para expressão no periplasma podem explicar as diferenças entre as massas observadas para as toxinas recombinantes e as massas moleculares previstas para as sequências maduras das toxinas.

A atividade esfingomielinásica de ambas as toxinas recombinantes mudou de acordo com o pH e a recLoxtox s1A apresentou maior atividade enzimática no pH 7,4 do que a recLoxtox. Ambas as toxinas recombinantes apresentaram atividade enzimática similares em pH 8,0. Um pH ótimo de 7,4 foi verificado para duas

fosfolipases D recombinantes de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) e um pH extremamente ácido e básico (2 e 9,5, respectivamente) alteraram a estrutura secundária dessas enzimas (Andrade et al., 2005, 2006). Ainda, uma fosfolipase D recombinante de *L. arizonica* (Gertsch & Mulaik, 1940) (LaSicTox_βID1) apresentou alta atividade esfingomielinásica em pH 8 (Lajoie et al., 2015a). As espécies de *Loxosceles* que habitam cavernas brasileiras têm um hábito generalista, alimentando-se de invertebrados de várias ordens, incluindo insetos pequenos e grandes, como diptera, blattodea e diplopoda (Souza-Silva e Ferreira, 2014). Foi relatado que algumas espécies de Diplopoda (*Chicobolus spec.*, *Rhapidostreptus virgator*), Chilopoda (*Lithobius forficatus*, *Scolopendra cingulata*) e Dipitera (*Culex pipiens*, *Aedes taeniorhynchus*, *Toxorhynchites amboinensis*) apresentam hemolinfa com pH variando de 7,37 a 8,5 (Xylander, 2009; Giblin e Platzer, 1984). Em baratas (*Nauphoeta cinerea*) o pH da hemolinfa muda (variando de 7,2 a 7,7) de acordo com a porcentagem de O₂ disponível no ambiente (Matthews e White, 2011). Nessa perspectiva, diferenças na atividade catalítica das Loxtox poderiam refletir uma adaptabilidade funcional dessas enzimas a mudanças nas condições de pH interno nas suas presas.

Estudos estruturais mostraram que as fosfolipases D de *Loxosceles* pertencem ao grupo da família de proteínas com o domínio GDPD, as quais possuem um loop βα1 curto conservado e um loop catalítico composto de 15 resíduos (Corde et al., 2018). Esses loops contêm dois resíduos de histidina (H¹² e H⁴⁷ para a PLD de *L. laeta* (Nicolet, 1849)) o qual é essencial para o mecanismo de catálise ácido-básico, bem como contêm cisteínas (C⁵², C⁵⁴, e C⁵⁸ para uma PLD de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934)) que forma uma ponte disulfeto entre o loop catalítico e uma ligação covalente do loop variável com um quarto resíduo de cisteína (C¹⁹⁸ para uma PLD de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934)) (Lajoie et al., 2015b; Murakami et al., 2006; Corde et al., 2018). Assim, com base em diferenças estruturais as enzimas PLD de *Loxosceles* foram agrupadas em duas classes (classes I e II), sendo que as proteínas de classe II foram subdivididas de acordo com sua capacidade (classe IIa) ou incapacidade (classe IIb) de hidrolisar esfingomielinina. Neste trabalho, o alinhamento múltiplo das sequências recombinantes, associado a modelagem 3D, mostrou que ambas as toxinas recombinantes conservaram resíduos importantes para a atividade catalítica (H¹⁶, H⁵², D⁴⁷, K⁹⁸, Y^{227/228}, W^{229/230},

D^{232/233}, N^{251/252}) ligação ao íon Mg²⁺ (E³⁶, D³⁸, D⁹⁶) e cisteínas envolvidas na formação de duas ligações dissulfeto (C⁵⁶, C⁵⁸, C⁶², C²⁰¹). Outra característica das enzimas PLD é a presença de um motivo na região C-terminal (ATYXDNPW), sendo que foi proposto que os resíduos D²²⁷ e W²⁸⁰ de uma PLD de *L. laeta* (Nicolet, 1849) estabelecem um contato energeticamente favorável com muitos resíduos e aumenta a estabilidade estrutural das PLDs (Cordes et al., 2018; Dias-Lopes et al., 2013). Todas as PLDs alinhadas mostraram esses resíduos conservados.

Além disso, a recLoxtox s1A apresentou alta similaridade com as fosfolipases D agrupados como classe IIa, enquanto a recLoxtox s11A compartilhou mais de 80% de identidade com sequências de fosfolipases D da classe IIb (Murakami et al., 2006; Magalhães et al., 2013; Lajoie et al., 2015b). No entanto, uma ampla gama de lisofosfolipídios é usada como substrato por fosfolipases D de *Loxosceles* (Lee e Lynch, 2005; Lajoie et al., 2013; Vuitika et al., 2016). Lajoie e colaboradores (2015b) mostraram que uma fosfolipase D recombinante de *Sicarius terrosus* (Nicolet, 1849) (StSicTox_βIB1i), que compartilha mais de 60% de identidade com recLoxtox s11A, apresenta menor atividade esfingomielinásica e alta preferência por substratos lipídicos com etanolamina. Os autores também mostraram que uma fosfolipase D recombinante de classe IIb de *L. arizonica* (Gertsch & Mulaik, 1940) (LaSicTox_βID1) apresentou alta atividade contra lipídios contendo colina, como a esfingomielina e a lisofosfatidilcolina (Lajoie et al., 2015a,b). Dessa forma, mais investigações são necessárias para verificar a atividade de toxinas recombinantes contra diferentes substratos.

Neste trabalho, a injeção de recLoxtox s1A (20 µg) e de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (3 µg) na pele de coelho causou efeitos similares como necrose progressiva, resposta inflamatória e alterações histológicas. Um efeito sinérgico entre os componentes do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) podem ter contribuído para a intensidade dos efeitos observados após a injeção de 3 µg de veneno. A recLoxtox s1A apresenta mais de 90% de identidade com LgRec1 de *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e LiRecDT1 de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), as quais demonstraram provocar dermonecrose com edema, eritema, equimose, palidez e uma intensa resposta inflamatória (Magalhães et al., 2013). Em contraste foram observados efeitos histopatológicos menos intensos, bem como ausência de necrose muscular e infiltrado inflamatório transiente após a injeção de 20 µg de recLoxtox s11A. A LiRecDT3 de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) e a Lb3 de *L.*

boneti (Gertsch, 1958), as quais compartilham mais de 80% de identidade com o recLoxtox s11A, foram capazes de induzir edema, inflamação, mas não uma lesão dermonecrótica na pele de coelhos (da Silveira et al., 2006; Ramos-Cerrilo et al., 2004). As diferenças nos efeitos *in vivo* observados para recLoxtox s11A em comparação com a recLoxtox s1A podem estar relacionadas a substituições de resíduos importantes entre as sequências de Loxtox. Recentemente foi demonstrada a importância do resíduo Y²²⁸ para as atividades dermonecrótica e enzimática de LiRecDT1, uma PLD recombinante de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (Vuitka et al., 2016). Também foi demonstrado que a mutação da tirosina sequencial (Y²²⁹) está relacionada a menor atividade esfingonielinásica e efeitos *in vivo* de LiRecDT1 e LgRecDT1, PLDs recombinantes de *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. gaucho* (Gertsch, 1967), respectivamente (da Silva et al., 2021). Em concordância, a recLoxtox s1A apresenta dois resíduos de tirosina conservados (Y²²⁷ e Y²²⁸), enquanto a recLoxtox s11A tem apenas um resíduo de tirosina (Y²²⁸) seguido por um resíduo de treonina (T²²⁹).

6.2. Propriedades imunológicas e moleculares

No presente estudo, soros imunes contendo anticorpos policlonais contra recLoxtox s1A, recLoxtox s11A e contra ambas as proteínas apresentaram reação cruzada com o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) no ELISA indireto, enquanto que o soro antiveneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) reagiu com os epitopos da recLoxtox s1A e recLoxtox s11A. Esses resultados sugerem que as toxinas recombinantes retêm determinantes antigênicos das enzimas Loxtox nativas. Além disso, o soro anti-recLoxtox s1A e o soro anti-recLoxtox s1A/s11A tiveram efeitos protetores significativos contra a atividade de esfingomielinase e as alterações *in vivo* provocadas pelo veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em comparação ao soro anti-recLoxtox s11A. Estes resultados sugerem que os anticorpos criados contra o recLoxtox s1A são mais relevantes na produção de soros neutralizantes. Além disso, a reatividade de regiões antigênicas específicas de diferentes toxinas foi relacionada à potência neutralizadora de antivenenos (Maria et al., 2005; Ramada et al., 2013). Nesse sentido, o uso de regiões imunogênicas de fosfolipases D e outras toxinas do veneno de *Loxosceles* têm sido explorados em diferentes protocolos de

imunização para produzir anticorpos eficazes e aperfeiçoar a produção de antivenenos (Felicori et al., 2009; Mendes et al., 2013; Figueiredo et al. al., 2014; Lima et al., 2018; Calabria et al., 2019). Assim, foram identificados epítopos lineares das sequências de recLoxtox s1A e de recLoxtox s11A que foram reconhecidos por cada soro imune.

Os peptídeos antigênicos foram localizados na superfície das toxinas recombinantes e incluíam resíduos do sítio ativos dessas enzimas. Os soros anti-recLoxtox s1A e anti-recLoxtox s1A/s11A reconheceram peptídeos de ambas as sequências das proteínas recombinantes, enquanto que o soro anti-recLoxtox s11A apresentou reatividade contra a recLoxtox s1A em ensaio de ELISA indireto, mas não mostrou reatividade contra os peptídeos lineares de recLoxtox s1A no ensaio de Spot e no *western blotting* em condições redutoras (com β -mercaptoetanol). Essa diferença sugere que o soro anti-recLoxtox s11A reage contra epítopos conformacionais de recLoxtox s1A. Foi mostrado que anticorpos policlonais que reagem contra epítopos conformacionais apresentam pouca ou nenhuma resposta imunogênica em ensaios de *western blotting* (Forstöm et al., 2015).

Em análise conjunta, esses resultados sugerem que as diferenças na reatividade imunológica dos epítopos estão relacionadas à substituição de resíduos nas sequências das toxinas recombinantes. Foi demonstrada que na LiD1, uma PLD recombinante de *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934), os resíduos E⁴⁴, Y⁴⁵, T⁴⁶, Y⁴⁷ presentes em um epítipo de 27 resíduos (²⁵NLGANSIETDVSFDDNANPEEYTYHGIP⁵¹) desempenha um importante papel na resposta imunogênica contra esta toxina recombinante (Dias-Lopes et al., 2010b). Curiosamente, uma região antigênica comum entre a recLoxtox s1A e a recLoxtox s11A apresentam alguns dos resíduos encontrados no epítipo LiD1. Os resíduos importantes para a resposta imunogênica contra LiD1 são igualmente conservados na sequência da recLoxtox s1A (E⁴⁸, Y⁴⁹, T⁵⁰, Y⁵¹), enquanto que três dos resíduos foram substituídos na sequência da recLoxtox s11A (K⁴⁸, E⁴⁹, M⁵⁰, Y⁵¹).

7. Conclusão

Neste trabalho foram caracterizadas a atividade funcional e as características estruturais de duas novas isoforma de Loxtox do veneno de *L. similis* (Moenkhaus,

1898). As fosfolipases D recombinantes apresentaram atividade esfingomielinásica dependente do pH do meio.

A injeção intradérmica em pele de coelho revelou que a recLoxtox s1A produz efeitos histopatológicos similares com as alterações encontradas para o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), como dermonecrose, exacerbado infiltrado inflamatório de neutrófilos e linfócitos, hemorragia e necrose muscular. A atividade macroscópica, histológica e macroscópica da recLoxtox s11A produz efeitos menos graves comparado a outra toxina recombinante, como edema, eritema e infiltrado inflamatório transiente.

Os soros produzidos contra as toxinas recombinantes e contra ambas as toxinas recombinantes foram capazes de reconhecer as toxinas recombinantes e o veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), bem como apresentaram reatividade imunogênica contra epitopos antigênicos específicos de cada toxina recombinante. Além disso, os anticorpos foram capazes de neutralizar a ação enzimática e a atividade necrótica do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898), sendo que o soro produzido com ambas as toxinas e o soro contendo anticorpos contra a recLoxtox s1A mais efetivos na neutralização dos efeitos *in vitro* e histopatológicos do veneno.

Este trabalho demonstra que as toxinas recLoxtox s1A e recLoxtox s11A desempenham papéis importantes no veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898). E o uso de regiões imunogênicas identificadas nas sequências das toxinas recombinantes pode produzir anticorpos contra os efeitos do veneno, contribuindo para o entendimento dos efeitos das fosfolipases D na patofisiologia do loxoscelismo.

8. Perspectivas

Tem-se como perspectiva deste trabalho:

- Analisar a atividade das toxinas nos efeitos sistêmicos do loxoscelismo por meio de ensaios *in vitro* com eritrócitos humanos;
- Analisar os efeitos deletérios *in vivo* em camundongos;

- Avaliar o potencial dos soros imunes produzidos em neutralizar o efeito letal do veneno em camundongos;
- Avaliar o potencial tóxico de recLoxtox s1A e recLoxtox s11A em diferentes espécies de insetos;
- Construir quimeras com as regiões antigênicas reconhecidas nas sequências das toxinas recombinantes e avaliar seu potencial na produção de anticorpos e suas potências neutralizantes.

9. Referências

- Abraham, M., Tilzer, L., Hoehn, K. S., & Thornton, S. L. (2015). Therapeutic Plasma Exchange for Refractory Hemolysis After Brown Recluse Spider (*Loxosceles reclusa*) Envenomation. *Journal of Medical Toxicology*, 11(3), 364–367. <https://doi.org/10.1007/s13181-015-0485-9>
- Albuquerque, P. L. M. M., Tessarolo, L. D., Menezes, F. H., De Lima, T. B., Paiva, J. H. H. G. L., Da Silva Júnior, G. B., Martins, A. M. C., & Daher, E. de F. (2018). Acute kidney injury due to systemic Loxoscelism: A cross sectional study in Northeast Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(5), 695–699. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0465-2017>
- 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), e31–e37. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2009.08.055>
- Andrade, S. A., Fernandes-Pedrosa, M. F., R.M.G., A., Oliva, M. L. V., 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>
- Andrade, S. A., Murakami, M. T., Cavalcante, D. P., Arni, R. K., & Tambourgi, D. V. (2006). Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinase D from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, 47, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.005>
- Araujo, D., Schneider, M. C., Zacaro, A. A., De Oliveira, E. G., Martins, R., Brescovit, A. D., Knysak, I., & Cella, D. M. (2020). Venomous *Loxosceles* Species (Araneae, Haplogynae, Sicariidae) from Brazil: 2nTM = 23 and X1X2Y Sex Chromosome System as Shared Characteristics. *Zoological Science*, 37(2),

128–139. <https://doi.org/10.2108/zs190128>

- Avelar, I. de O., Almeida, L. R. de, Santos, H. A. dos, Lima, W. dos S., Lara, L. B., & Ecco, R. (2014). *Sicarius uncinipenis* and *Deletocephalus cesarpintoi* in captive greater rheas of Minas Gerais State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(3), 355–359. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014053>
- Barbaro, K. C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., & Winkel, K. (2005). Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon*, 45(4), 489–499. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.009>
- Barrett, S. M., Romine-Jenkins, M., & Blick, K. E. (1993). Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clinical Chemistry*, 39(10), 2104–2107. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.10.2104>
- Bertani, R., Von Schimonsky, D. M., Gallão, J. E., & Bichuette, M. E. (2018). Four new troglophilic species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832: Contributions to the knowledge of recluse spiders from Brazilian caves (Araneae, Sicariidae). *ZooKeys*, 2018(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), 1241–1253. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.008>
- Binford, G. J., Bodner, M. R., Cordes, M. H. J., Baldwin, K. L., Rynerson, M. R., Burns, S. N., & Zobel-Thropp, P. A. (2009). Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Molecular Biology and Evolution*, 26(3), 547–566. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn274>
- Binford, G. J., Callahan, M. S., Bodner, M. R., Rynerson, M. R., Núñez, P. B., Ellison, C. E., & Duncan, R. P. (2008). Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 538–553. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.08.003>
- 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), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00045-9)

- Biscoto, G. L.. (2018). Nanotecnologia no diagnóstico de acidentes com aranhas *Loxosceles similis*. Dissertação de Mestrado, Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Calabria, P. A. L., Shimokaw-Falcão, L. H. A. L., Colombini, M., Moura-da-Silva, A. M., Barbaro, K. C., Faquim-Mauro, E. L., & Magalhães, 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>
- Cetinkaya, A., Aydin, K., Sirakaya, H. A., & Yilmaz, R. (2020). A loxoscelism case received therapeutic apheresis and hyperbaric oxygen therapy. *Saudi Medical Journal*, 41(12), 1364–1368. <https://doi.org/10.15537/smj.2020.12.25544>
- Chaim, O. M., Sade, Y. B., da Silveira, R. B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., Veiga, S. S. (2006). Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 211(1), 64-77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.015>
- 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*, 1811(2), 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.11.005>
- Chatzaki, M., Horta, C. C. R., Pereira, N. B. A., 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., de Moraes, F. R., Caruso, Í. P., Chaim, O. M., Senff-Ribeiro, A., Ullah, A., da Silva, L. S., Chahine, J., Arni, R. K., & Veiga, S. S. (2017). Potential Implications for Designing Drugs Against the Brown Spider Venom Phospholipase-D. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(4), 726–738. <https://doi.org/10.1002/jcb.25678>
- Chaves-Moreira, D., Matsubara, F. H., Schemczssen-Graeff, Z., De Bona, E.,

- Heidemann, V. R., Guerra-Duarte, C., Gremski, L. H., Chávez-Olórtegui, C., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., Arni, R. K., & Veiga, S. S. (2019). Brown spider (*Loxosceles*) venom toxins as potential biotools for the development of novel therapeutics. *Toxins*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/toxins11060355>
- 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*(6), 23–26. <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>
- Chávez-Olórtegui, C., Amara, D. A., Rochat, H., Diniz, C., & Granier, C. (1991). In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine*, *9*(12), 907–910. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(91\)90012-u](https://doi.org/10.1016/0264-410x(91)90012-u)
- Chávez-Olórtegui, C., Zanetti, V. C., Ferreira, A. P., Minozzo, J. C., Mangili, O. C., & Gubert, I. C. (1998). ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon*, *36*(4), 563–569. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00159-1)
- Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., Mutoh, T., Lin, M. E., Teo, S. T., Park, K. E., Mosley, A. N., & Chun, J. (2010). LPA receptors: Subtypes and biological actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *50*, 157–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753>
- Cordes, M. H. J., & Binford, G. J. (2018). Evolutionary dynamics of origin and loss in the deep history of phospholipase D toxin genes. *BMC Evolutionary Biology*, *18*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1302-2>
- Corrêa, M. A., Okamoto, C. K., Gonçalves-De-andrade, R. M., Van Den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2016). Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom induces the expression of MMP7 in human keratinocytes: Contribution to dermonecrosis. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153090>
- Costa, T. G. F., Costal-Oliveira, F., de Assis, T. C. S., Lima, S. A., Martins, C. A., Finco, A. B., Veiga, S. S., Soccol, V. T., Machado-de-Ávila, R. A., Figueiredo, L. F. M., Minozzo, J. C., Kalapothakis, E., Guerra-Duarte, C., Alvarenga, L. M., & Chávez-Olórtegui, C. (2020). Engineered antigen containing epitopes from *Loxosceles* spp. spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3)

against astacin-like metalloproteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 490–500. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.176>

da Silva, M. S., Lopes, P. H., Elias, M. C., & Tambourgi, D. V. (2020). Cytotoxic and genotoxic effects on human keratinocytes triggered by sphingomyelinase D from *Loxosceles* venom. *Archives of Toxicology*, 94(10), 3563–3577. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02830-2>

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 Silva, T. P., de Castro, F. J., Vuitika, L., Polli, N. L. C., Antunes, B. C., Bóia-Ferreira, M., Minozzo, J. C., Mariutti, R. B., Matsubara, F. H., Arni, R. K., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., Gremski, L. H., & Veiga, S. S. (2021). Brown spiders' phospholipases-d with potential therapeutic applications: Functional assessment of mutant isoforms. *Biomedicines*, 9(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030320>

da Silva, T. S. (2018). Análise do transcriptoma da glândula de peçonha de *Loxosceles similis*. Dissertação de Mestrado, Genética. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

da Silveira, Rafael Berton, Pigozzo, R. B., Chaim, O. M., Appel, M. H., Silva, D. T., Dreyfuss, J. L., Toma, L., Dietrich, C. P., Nader, H. B., Veiga, S. S., & Gremski, W. (2007). Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie*, 89(3), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.002>

da Silveira, Rafael B., 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), 1241–1253. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.008>

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, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.002>

Dantas, A. E., Horta, C. C. R., Martins, T. M. M., Carmo, A. O., Oliveira-Mendes, B. B. R., 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.2004.06.013>

- 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(January). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109759>
- De Castro, C. S., Silvestre, F. G., Araújo, S. C., Yazbeck, G. D. 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 Moura, J., Felicori, L., Moreau, V., Guimarães, G., Dias-Lopes, C., Molina, L., Alvarenga, L. M., Fernandes, P., Frézard, F., Ribeiro, R. R., Fleury, C., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2011). Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine*, 29(45), 7992–8001. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.065>
- De Oliveira, Kátia C., Gonçalves De Andrade, R. M., Piazza, R. M. F., Ferreira, J. M. C., Van Den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2005). Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*, 45(4), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.022>
- De Oliveira, Kátia Cristina, Gonçalves De Andrade, R. M., Giusti, A. L., Da Silva, W. D., & Tambourgi, D. V. (1999). Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. *Toxicon*, 37(1), 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00130-5)
- De Oliveira-Lima, K., Farsky, S. H. P., Lopes, P. H., De Andrade, R. M. G., Van Den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2016). Microcirculation abnormalities provoked by *Loxosceles* spiders' envenomation. *Toxicon*, 116, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.005>
- Delano, W. L. (2017). *The PyMOL Molecular Graphics System* (PyMol, v2). DeLano Scientific. <http://www.pymol.org>
- Dias-Lopes, Camila, 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. (2010a). 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>

- Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L. F., Fernandes, P., Emery, L., Kalapothakis, E., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2010b). A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. *Toxicon*, *55*, 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.019>
- Dias-Lopes, Camila, Neshich, I. A. P., Neshich, G., Ortega, J. M., Granier, C., Chávez-Olórtegui, C., Molina, F., & Felicori, L. (2013). Identification of new sphingomyelinases D in pathogenic fungi and other pathogenic organisms. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079240>
- Dufour, L. (1820c). Descriptions de cinq arachnides nouvelles. *Annales Générales des Sciences Physiques* 5: 198-209.
- Felicori, L. F., Fernandes, P. B., Giusta, M. S., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E., Nguyen, F., Molina, C., 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>
- 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*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>
- Ferreira, L. R., Prous, X., Fortes Machado, S., & Parentoni Martins, R. (2005). Population dynamics of *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898) in a Brazilian dry cave: a new method for evaluation of population size. *Revista Brasileira de Zootecias*, *7*(1).
- 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, L. F. M., Dias-Lopes, C., Alvarenga, L. M., Mendes, T. M., Machado-de-Ávila, R. A., McComarck, J., Minozzo, J. C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2014). Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. *Toxicon*, *86*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.007>
- Fischer, M. L., Vasconcellos-Neto, J. (2005). Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná,

Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 42(5), 756-765.
[https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2005\)042\[0756:MOBLIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0756:MOBLIA]2.0.CO;2).

Fischer, M. L., Vasconcellos-Neto, J., & Dos Santos Neto, L. G. (2006). The prey and predators of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão 1934 (Araneae, Sicariidae). *Journal of Arachnology*, 34(2), 485–488. <https://doi.org/10.1636/M03-51.1>

Forsström, B., Bisławska Axnäs, B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A., & Uhlen, M. (2015). Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS ONE*, 10(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121673>

Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. A., King, G. F., Nevalainen, T. J., Norman, J. A., Lewis, R. J., Norton, R. S., Renjifo, C., & Rodríguez De La Vega, R. C. (2009). The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 483–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>

Fujiwara, Y. (2008). Cyclic phosphatidic acid—a unique bioactive phospholipid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(9), 519-524. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.05.002>.

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). <https://doi.org/10.3390/toxins9060191>

Fukushima, C. S., Andrade, R. M. G. de & Bertani, R. (2017). Two new Brazilian species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 with remarks on *amazonica* and *rufescens* groups (Araneae, Sicariidae). *ZooKeys* 667: 67-94. <https://doi.org/10.3897/zookeys.667.11369>

Futrell, J. M. (1992). Loxoscelism. *American Journal of the Medical Sciences*, 304(4), 261–267. <https://doi.org/10.1097/00000441-199210000-00008>

Gertsch, W. J. & Mulaik, S. (1940). The spiders of Texas. I. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 77: 307-340

Gertsch, W. J. (1958). The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America, and the West Indies. *American Museum Novitates* 1907: 1-46.

Gertsch, W. J. (1967). The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bulletin of the AMNH*; v. 136, article 3.

Gertsch, W. J., Ennik, F. (1983). The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America, and the West Indies (Araneae, Loxoscelidae). El género de arañas *Loxosceles* en Norteamérica, Centroamérica y las Indias Occidentales

(Araneae, Loxoscelidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History.*, 175(3), 263-360.

Giblin, R. M., & Platzer, E. G. (1984). Hemolymph pH of the Larvae of three species of mosquitoes, and the effect of *Romanomermis culicivorax* parasitism on the blood pH of *Culex pipiens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44, 63–66.

Grashof, D., Zdenek, C. N., Dobson, J. S., Youngman, N. J., Coimbra, F., Benard-Valle, M., Alagon, A., & Fry, B. G. (2020). A web of coagulotoxicity: Failure of antivenom to neutralize the destructive (non-clotting) fibrinogenolytic activity of loxosceles and sicarius spider venoms. *Toxins*, 12(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins12020091>

Gremski, L. H., Da Justa, H. C., Da Silva, T. P., Polli, N. L. C., Antunes, B. C., Minozzo, J. C., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., Arni, R. K., & Veiga, S. S. (2020). Forty years of the description of brown spider venom phospholipases-D. *Toxins*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/toxins12030164>

Gremski, L. H., Da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Probst, C. M. A., Ferrer, V. P., Nowatzki, J., Weinschutz, H. C., Madeira, H. M. I., 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), 2403–2416. <https://doi.org/10.1039/c004118a>

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>

Gonçalves, P. M. (2017). Estudo dos efeitos renais da peçonha de aranha *Loxosceles similis*. Dissertação. Centro Universitário de Sete Lagoas UNIFEMM, Sete Lagoas.

Guglielmetti, A., Jahr, C., & Gompertz-Mattar, M. (2019). Autologous fibroblasts for the treatment of cutaneous loxoscelism: First experience. *International Wound Journal*, 16(6), 1503–1505. <https://doi.org/10.1111/iwj.13222>

Hadanny, A., Fishlev, G., Bechor, Y., Meir, O., & Efrati, S. (2016). Nonhealing wounds caused by brown spider bites: Application of hyperbaric oxygen therapy. *Advances in Skin and Wound Care*, 29(12), 560–566. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000504578.06579.20>

Herzig, V., Cristofori-Armstrong, B., Israel, M. R., Nixon, S. A., Vetter, I., & King, G. F.

(2020). Animal toxins — Nature's evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery. *Biochemical Pharmacology*, 181, 114096. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114096>

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

Horta, C. C. R., Oliveira-Mendes, B. B. R., Siqueira, F. F., Barroca, T. M., Ferreira, R., & Kalapothakis, E. (2013). Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with loxosceles spider venom. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(6), 1682–1685. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.40>

Isbister, G. K., & Fan, H. W. (2011). Spider bite. *The Lancet*, 378(9808), 2039–2047. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62230-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62230-1)

Jacomini, I., Silva, S. K., Aubrey, N., Muzard, J., Chavez-Olortegui, C., De Moura, J., Billiald, P., & Alvarenga, L. M. (2016). Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. *Immunology Letters*, 173, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.03.001>

Justa, H. C. da, Matsubara, F. H., de-Bona, E., Schemczssen-Graeff, Z., Polli, N. L. C., de Mari, T. L., Boia-Ferreira, M., Minozzo, J. C., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., Gremski, L. H., & Veiga, S. S. (2020). LALLT (*Loxosceles* Allergen-Like Toxin) from the venom of *Loxosceles intermedia*: Recombinant expression in insect cells and characterization as a molecule with allergenic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3984–3999. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.212>

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: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 40(12), 1691–1699. <https://doi.org/S0041010102002015> [pii]

Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., Castro, C. S., Silvestre, F. G., Laborne, J. F., Moura, J. F., Veiga, S. S., Chávez-Olórtegui, C., Granier, C., & Barbaro, K. C. (2007). The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. *Toxicon*, 50(7), 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.001>

Keyserling, E. (1891). *Die Spinnen Amerikas. Brasilianische Spinnen*. Bauer & Raspe, Nürnberg 3, 1-278. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.64832>

- Kiefer, F., Arnold, K., Künkli, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res*, *37*, 387–392. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn750>
- King, G. F. (2011). *King2011*. 1469–1484.
- Krywko, D. M., & Gomez, H. F. (2002). Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: A comparison of 4 venom recovery methods. *Annals of Emergency Medicine*, *39*(5), 475–480. <https://doi.org/10.1067/mem.2002.123551>
- 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>
- 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>
- Lajoie, D. M., & Cordes, M. H. J. (2015a). Spider, bacterial and fungal phospholipase D toxins make cyclic phosphate products. *Toxicon*, *108*, 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.008>
- Lajoie, D.M., Roberts, S. A., Zobel-Thropp, P. A., Delahave, J. L., Bandarin, V., Binford, G. J., & Cordes, M. H. (2015b). 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>
- Lajoie, Daniel M., Zobel-Thropp, P. A., Kumirov, V. K., Bandarian, V., Binford, G. J., & Cordes, M. H. J. (2013). Phospholipase D Toxins of Brown Spider Venom Convert Lysophosphatidylcholine and Sphingomyelin to Cyclic Phosphates. *PLoS ONE*, *8*(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072372>
- Laune, L., Molina, F., Ferrieres, G., Villard, S., Bés, C., & Rieunier, F. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods*, *267*, 53–70. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00140-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00140-0)
- 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>
- Lima, S. D. A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Mendes, T. M., Figueiredo, L. F.

- M., Oliveira, D., Machado-de-Ávila, R. A., Ferrer, V. P., Trevisan-Silva, D., Veiga, S. S., Minozzo, J. C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2018). Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Frontiers in Immunology*, 9, 653. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00653>
- Lopes, P. H., Fukushima, C. S., Shoji, R., Bertani, R., & Tambourgi, D. V. (2021a). Searching for the toxic potential of *Loxosceles amazonica* and *Loxosceles willianilsoni* spiders' venoms. *Toxicon*, 191(September 2020), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.006>
- Lopes, P. H., Fukushima, C. S., Shoji, R., Bertani, R., & Tambourgi, D. V. (2021b). Sphingomyelinase D Activity in *Sicarius tropicus* Venom: Toxic Potential and Clues to the Evolution of SMases D in the Sicariidae Family. *Toxins*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/toxins13040256>
- Lopes, P. H., Murakami, M. T., Portaro, F. C. V., Mesquita Pasqualoto, K. F., van den Berg, C., & Tambourgi, D. V. (2019). Targeting *Loxosceles* spider Sphingomyelinase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for loxoscelism. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 310–321. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1546698>
- 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>
- Lowrie O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R. J.. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-276.
- Lucato, R. V., Abdulkader, R. C. R. M., Barbaro, K. C., MendesGlória, G. E., Castro, I., Baptista, M. A. S. F., CuryPatríc, P. M., Malheiros, D. M. C., Schor, N., Yu, L., & Burdmann, E. A. (2011). *Loxosceles gaucho* venom-induced acute kidney injury - in vivo and in vitro studies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), 4–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001182>
- Lutz A, Mello O. Descrição de 5 espécies brasileiras dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. *Folha Méd.* 1922;3(4):25–26.
- Machado, E. O., Álvares, E. S. S., 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*, 5(2), 113–115.
- Magalhães, G. S., Caporrino, M. C., Della-Casa, M., 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, *95*(9), 1773–1783. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.002>
- Malaque, C. M. S. A., Vetter, R. S., Entres, M. (2017) *Loxosceles* spider. Critical Care Toxicology, Diagnosis and Management of the Critically Poisoned Patient. Springer, J. Brent et al. (second edition), 2578-2591.
- 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), 139–143. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000300005>
- Malaque, C. M. S., Santoro, M. L., Cardoso, J. L. C., Conde, M. R., Novaes, C. T. G., Risk, J. Y., França, F. O. S., de Medeiros, C. R., & Fan, H. W. (2011). Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon*, *58*(8), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.011>
- Maria, W. S., Velarde, D. T., Alvarengua, L. M., Nguyen, C., Villard, S., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2005). Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* Scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon*, *46*, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.024>
- 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*(June), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.014>
- Mattheus, P. G. D., & White, C. R. (2011). Regulation of gas exchange and haemolymph pH in the cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Journal of Experimental Biology*, *214*, 3062–3073. <https://doi.org/10.1242/jeb.053991>
- Mello-Leitão, C. F. de (1934). Especies brasileiras do genero *Loxosceles* Lowe. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 6: 69-73.
- McGlasson, D. L., Green, J. A., Stoecker, W. V., Babcock, J. L., & Calcara, D. A. (2009). Duration of *Loxosceles reclusa* venom detection by ELISA from swabs. *Clinical Laboratory Science: Journal of the American Society for Medical Technology*, *22*(4), 216–222.
- Meeteren, L. A. V., Frederiks, F., Giepmans, B. N. G., Fernandes-Pedrosa, M. F., Billington, S.J., Helen-Jost, B., Tambougi, D. V., Moolenaar, W. H. (2004). Spider and Bacterial Sphingomyelinaes D target cellular lysophosphatidic acid

receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (12), 10833-10836. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300563200>. Epub 2004 Jan 19

- 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>
- Mendes, T. M., Oliveira, D., Figueiredo, L. F. M., Machado-de-Avila, R. A., Duarte, C. G., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Minozzo, J. C., & Chávez-Olórtegui, C. (2013). Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine*, 31(25), 2749–2755. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.048>
- Miller, M. S., Ortegon, M., & McDaniel, C. (2007). Negative pressure wound therapy: Treating a venomous insect bite. *International Wound Journal*, 4(1), 88–92. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00231.x>
- Miranda, A. L. S. de, Guerra-Duarte, C., Lima, S. de A., Chávez-Olórtegui, C., & Soto-Blanco, B. (2021). History, challenges and perspectives on *Loxosceles* (brown spiders) antivenom production in Brazil. *Toxicon*, 192(January), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.01.004>
- Ministério da Saúde, Governo Federal. Brasil. (2001). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 120p.
- Ministério da Saúde, Governo Federal. Brasil. Portal da Saúde. (2021). Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net, 2021. Available at: <HTTP://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso: Junho 2021
- Moenkhaus, W. J. (1898). Contribuição para o conhecimento das aranhas de S.-Paulo. *Revista do Museu Paulista* 3: 77-112.
- 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)
- Moro, L., Martins, A. S., Alves, C. M., Santos, F. G. A., Nunes, J. E. S., Carneiro, R.

- A., Carvalho, R., & Vasconcelos, A. C. (2003). Apoptosis in canine distemper. *Archives of Virology*, 148(153–164). <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0903-6>
- Mota, I., Barbaro, K. C. E. (1995). Biological and biochemical properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 14(3), 401-421. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.002>.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M. F., 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>
- Murakami, Mário T., Fernandes-Pedrosa, M. F., Tambourgi, D. V., & Arni, R. K. (2005). Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13658–13664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412437200>
- Nentwig, W., Pantini, P., & Vetter, R. S. (2017). Distribution and medical aspects of *Loxosceles rufescens*, one of the most invasive spiders of the world (Araneae: Sicariidae). *Toxicon*, 132, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.007>
- Newlands, G. (1980). A new spelaeon species of *Loxosceles* (Araneae: Sicariidae). *Journal of the Entomological Society of South Africa* 43: 367-369.
- Nicolet, H. (1849). Aracnidos. In: Gay, C. (ed.) *Historia física y política de Chile. Zoología* 3, 319-543, pl. 1-5. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.16172>
- Nguyen, N., & Pandey, M. (2019). Loxoscelism: Cutaneous and Hematologic Manifestations. *Advances in Hematology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4091278>
- Nowatzki, J., de Sene, R. V., Paludo, K. S., Veiga, S. S., Oliver, C., Jamur, M. C., Nader, H. B., Trindade, E. S., & Franco, C. R. C. (2010). Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. *Toxicon*, 56(4), 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.027>
- Nowatzki, J., Sene, R. V., Paludo, K. S., Rizzo, L. E., Souza-Fonseca-Guimarães, F., Veiga, S. S., Nader, H. B., Franco, C. R. C., & Trindade, E. S. (2012). Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. *Toxicon*, 60(3), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.333>
- 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), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/toxins9030090>

- Oliveira-Mendes, B. B. R., Chatzaki, M., Sales-Medina, D. F., Leal, H. G., Van der Veer, R., Biscoto, G. L., Gonçalves, P. M., Silva, T. S., 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, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.11.002>
- Oliveira-Mendes, B. B. R., Miranda, S. E. M., Sales-Medina, D. F., Magalhães, B. F., Kalapothakis, Y., de Souza, R. P., Cardoso, V. N. de Barros, A. L. B., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E.. (2019). Inhibition of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase affects venom biodistribution. *PLOS, Neglected Tropical Diseases*, 13(4), e0007048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007048>.
- Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estévez, J., Clement, H., Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Vázquez, H., Zavaleta, A., Arruz, M. S., 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>
- Ospedal, K. Z., Appel, M. H., Neto, J. F., Mangili, O. C., Veiga, S. S., & Gremski, W. (2002). Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *International Journal of Experimental Pathology*, 83(6), 287–294. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2002.00241.x>
- 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>
- Paludo, K. S., Gremski, L. H., Veiga, S. S., Chaim, O. M., Gremski, W., Buchi, D. de F., Nader, H. B., Dietrich, C. P., & Franco, C. R. C. (2006). The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon*, 47(8), 844–853. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.006>
- Paolino, G., Vaira, F., Mercuri, S. R., & Di Nicola, M. R. (2020). Fast recognition of *Loxosceles rufescens* in Italian spider bites to avoid misdiagnosis, alarmism and start a prompt treatment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(9), e482–e484. <https://doi.org/10.1111/jdv.16395>
- Patel, K. D., Modur, V., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M., & McIntyre, T. M. (1994). The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-

CSF, IL-8, and E-selectin expression. *Journal of Clinical Investigation*, 94(2), 631–642. <https://doi.org/10.1172/jci117379>

Pauli, I., Puka, J., Gubert, I. C., & Minozzo, J. . C. (2006). The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon*, 48(2), 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.05.005>

Pauli, I., Minozzo, J. C., da Silva, P. H., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2009). Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon*, 53(6), 660-671. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.033>

Pennington, M. W., Czerwinski, A., & Norton, R. S. (2018). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(10), 2738–2758. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>

Pereira, N. B. A., 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>

Pereira, N. B. A., Kalapothakis, E., Vasconcelos, A. C., Chatzaki, M., Campos, L. P., Vieira, F. O., Verçosa, B. L. A., Silva, S. S., Ferrira, W. M., & Moro, L. (2012a). Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18(3), 277–286. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000300005>

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. (2012b). 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>

Perty. Spix JB, Martius CFP. Delectus animalium articulorum, quae in itinere per Brasiliam annis MDCCCXVIII-MDCCCXX [...]. Monachii: prostat apud, lipsiae apud frid., fleischer in comm; 1830.

Planas, E., & Ribera, C. (2014). Uncovering overlooked island diversity: COLONIZATION and diversification of the medically important spider genus *Loxosceles* (Arachnida: Sicariidae) on the Canary Islands. *Journal of Biogeography*, 41(7), 1255–1266. <https://doi.org/10.1111/jbi.12321>

Planas, E., Zobel-Thropp, P. A., Ribeca, C., Binford, G.. (2015). Not as docile as it looks? *Loxosceles* venom variation and loxoscelism in the Mediterranean Basin

and the Canary Islands. *Toxicon*, 93, 11-19.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.005>.

Platnick, N. I.. (2021). World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 18.5, accessed on 17 Junho 2021.

Plenge-Tellechea, L. F., Hernández-Ramos, Á. D., Muñoz, J. M., Barraza-Garza, G., Rico-Escobar, E., & Meléndez-Martínez, D. (2019). Acanthocytosis and brain damage in area postrema and choroid plexus: Description of novel signs of *Loxosceles apachea* envenomation in rats. *PLoS ONE*, 14(2), 1–13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211689>

Purcell, W. F. (1904). Descriptions of new genera and species of South African spiders. *Transactions of the South African Philosophical Society* 15: 115-173.

Ramada, J. S., Becker-Finco, A., Minozzo, J. C., Felicori, L. F., Machado-de-Ávila, R. A., Molina, F., Nguyen, C., Moura, J., Chávez-Olórtegui, C., & Alvarengua, L. M. (2013). Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. *Toxicon*, 73, 47–55.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.007>

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(5507–514).
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.06.013>

Rivera, I. G., Ordoñez, M., Presa, N., Gomez-Larrauri, A., Simón, J., Trueba, M., & Gomez-Muñoz, A. (2015). Sphingomyelinase d/ceramide 1-phosphate in cell survival and inflammation. *Toxins*, 7(5), 1457–1466.
<https://doi.org/10.3390/toxins7051457>

Rodríguez-Roiz JM, Ballesteros-Betancourt JR, Rodríguez-Roiz VA et al (2017) A life-threatening situation due to a spider bite : a non-infectious necrotizing fasciitis. *Acta Orthop Belg* 83:326–329

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. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(1), 170–177.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.013>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Segura-Ramírez, P. J., & Silva Júnior, P. I. (2018). *Loxosceles gaucho* spider venom: An untapped source of antimicrobial agents. *Toxins*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/toxins10120522>
- Silvestre, F. G., Castro, C. S., Moura, J. F., Giusta, M. S., Maria, M., Álvares, E. S. S., Lobato, R. A., Assis, L. A., Gonçalves, I. C., Gubert, 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>
- Simon, E. (1897). Viaggio del Dott. A. Borelli nella République Argentina e nel Paraguay. Liste des arachnides recueillis aux Iles du Cap-Vert, dans la République Argentine et le Paraguay et descriptions d'espèces nouvelles. *Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della Reale Università di Torino* 12(270): 1-8
- Simon, E. (1907). Etude sur les araignées de la sous-section des Haplogynes. *Annales de la Société Entomologique de Belgique* 51: 246-264.
- Siqueira, R. A. G. B., Calabria, P. A. L., Caporrino, M. C., Tavora, B. C. L. F., Barbaro, K. C., Faquim-Mauro, E. L., Della-Casa, M. S., & Magalhães, G. S. (2019). When spider and snake get along: Fusion of a snake disintegrin with a spider phospholipase D to explore their synergistic effects on a tumor cell. *Toxicon*, 168(June), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.225>
- Souza-Silva, M., & Ferreira, R. L. (2014). *Loxosceles spiders* (Araneae: Sicariidae) preying on invertebrates in Brazilian caves. *Speleobiology Notes*, 6, 27–32. <https://doi.org/10.5563/spbn.v6i0.46>
- Sunderkötter, C., Seeliger, S., Schönlau, F., Roth, J., Hallmann, R., Luger, T. A., Sorg, C., & Kolde, G. (2001). Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. *Experimental Dermatology*, 10(6), 391–404. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2001.100602.x>
- Swanson, D. L., & Vetter, R. S. (2005). Bites of Brown Recluse Spiders and Suspected Necrotic Arachnidism. *New England Journal of Medicine*, 352(7), 700–707. <https://doi.org/10.1056/nejmra041184>
- Swanson, D. L., & Vetter, R. S. (2006). Loxoscelism. *Clinics in Dermatology*, 24(3), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.clinidermatol.2005.11.006>
- Tambourgi DV, Paixão-Cavalcante D, Gonçalves De Andrade RM et al (2005) *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *J Invest Dermatol* 124:725–731. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23654.x>
- Tavares, F. L., Peichoto, M. E., Rangel, D. D. M., Barbaro, K. C., Cirillo, M. C.,

- Santoro, M. L., & Sano-Martins, I. S. (2011). *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. *Human and Experimental Toxicology*, *30*(10), 1567–1574. <https://doi.org/10.1177/09603271110393761>
- Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., & Griffiths, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, *41*(5), 541–557. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00393-8)
- 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>
- Tormos F. E., Corella Montoya, F., Martínez Izquierdo, M. Á., Sánchez-Artola, B., Limousin Aranzabal, B., & Larraínzar-Garijo, R. (2019). Infection Due to *Saksenaea vasiformis* Following a Spider Bite. *Journal of Hand Surgery*, *44*(7), 619.e1-619.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2018.08.020>
- Ullah, A., Giuseppe, P. O., Murakami, M. T., Trevisan-Silva, D., Wille, A. C. M., Chaves-Moreira, D., Gremski, L. H., Silveira, R. B., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., Veiga, S. S., & Arni, R. K. (2011). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, *67*(2234–236). <https://doi.org/10.1107/S1744309110050931>
- Van Aswegen, G., Van Rooyen, J. M., Van Der Nest, D. G., Veldman, F. J., De Villiers, T. H., & Oberholzer, G. (1997). Venom of a six-eyed crab spider, *Sicarius testaceus* (Purcell, 1908), causes necrotic and haemorrhagic lesions in the rabbit. *Toxicon*, *35*(7), 1149–1152. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00203-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00203-6)
- 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), 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00254-7)
- Vetter, R. S., Cushing, P. E., Crawford, R. L., & Royce, L. A. (2003). Diagnoses of brown recluse spider bites (loxoscelism) greatly outnumber actual verifications of the spider in four western American states. *Toxicon*, *42*(4), 413–418.

[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00173-9)

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>

Vetter, R. S., Visscher, P. K.. (1998). Bites and stings of medically important venomous arthropods. *Int. Journal of Dermatol.*, 37, 481-496.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.1998.00455.x>

Vuitika, L., Chaves-Moreira, D., Caruso, I., Lima, M. A., Matsubara, F. H., Murakami, M. T., Takahashi, H. K., Toledo, M. S., Coronado, M. A., Nader, H. B., & Senff-Ribeiro, A. (2016). Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(9), 970–979. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2016.05.009>

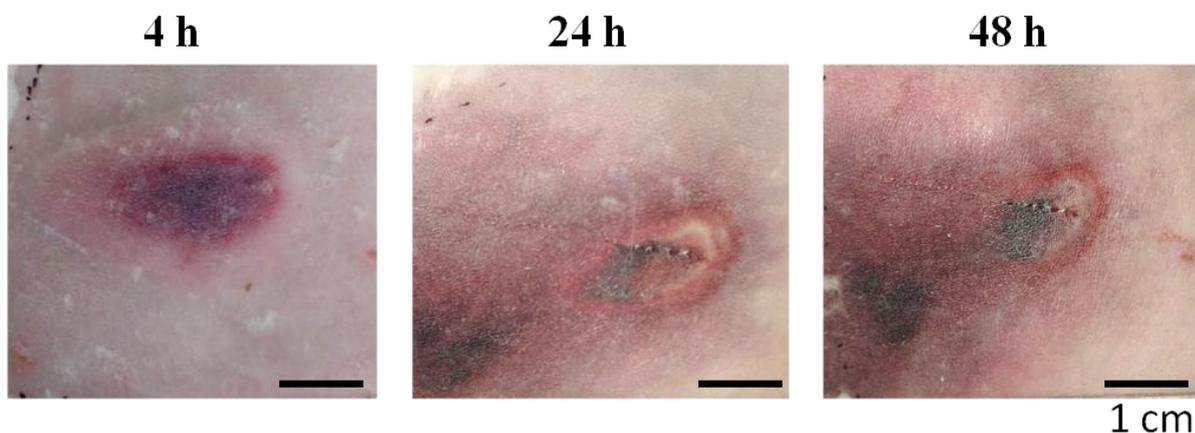
Wilson, D., & Daly, N. L. (2018). Venomics: A mini-review. *High-Throughput*, 7(3).
<https://doi.org/10.3390/HT7030019>

Xylander, W. E. R. (2009). Physico-chemical properties of haemolymph of Chilopoda and Diplopoda (Myriapoda, Arthropoda): protein content, pH, osmolarity. *Soil Organisms*, 81(3), 431–439.

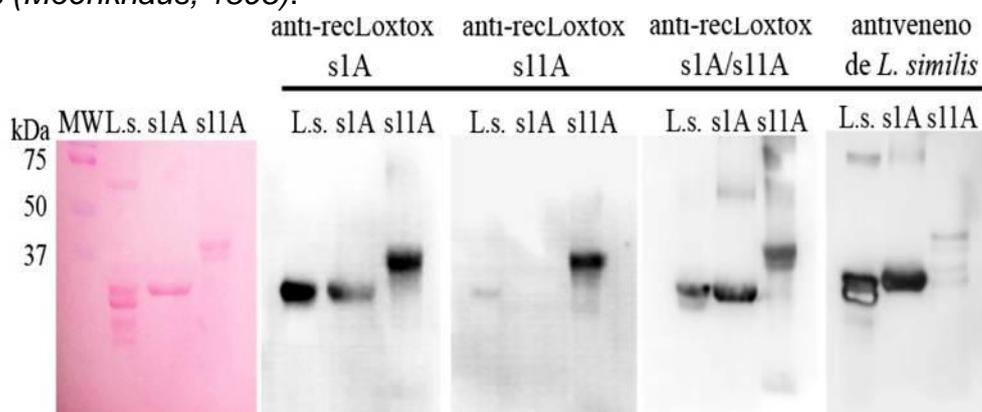
Zobel-Thropp, P. A., Kerins, A. E., & Binford, G. J. (2012). Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. *Toxicon*, 60(3), 265–271.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.350>

10. Anexos

Anexo 1 FIGURA A 1 Injeção de 10 µl de veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) em pele de coelho. A lesão foi analisada as 4, 24 e 48 h após a injeção do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898).

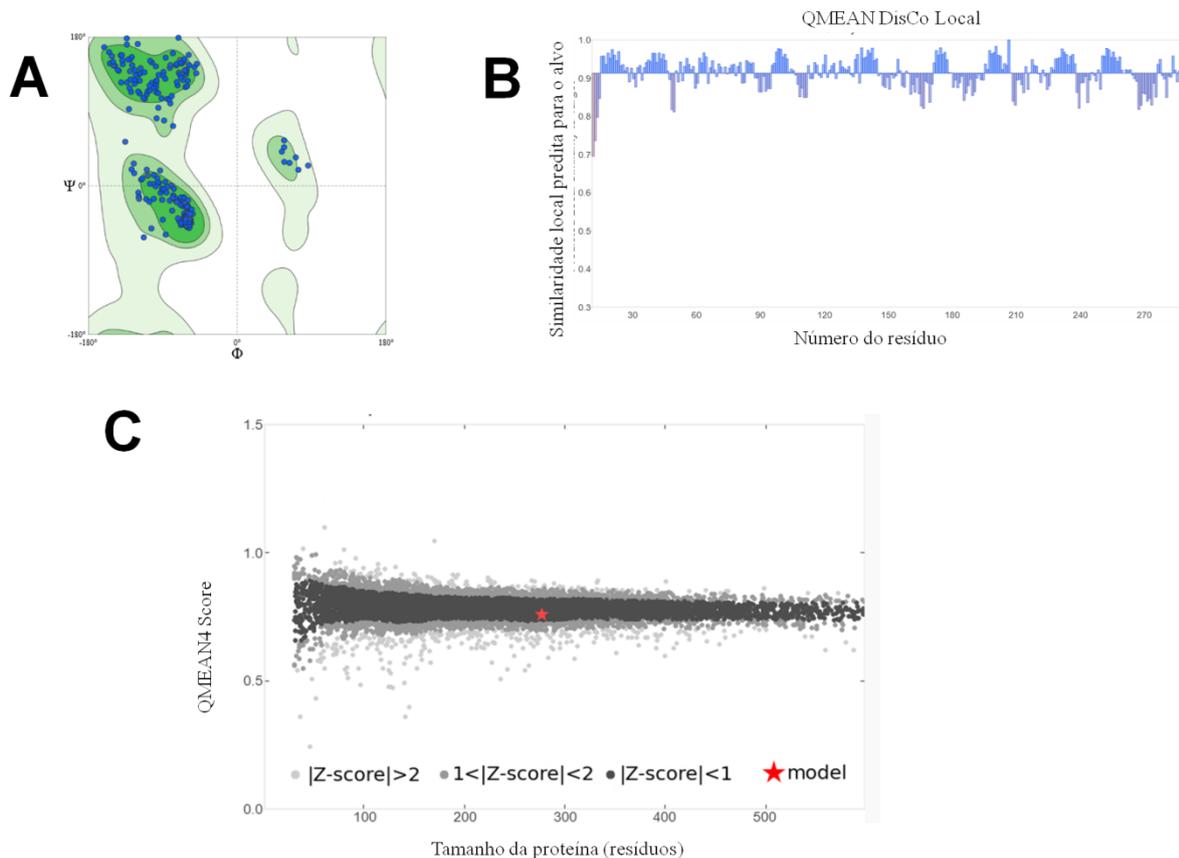


Anexo 2 FIGURA A 2 Western-blotting das toxinas recombinantes e do veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898).



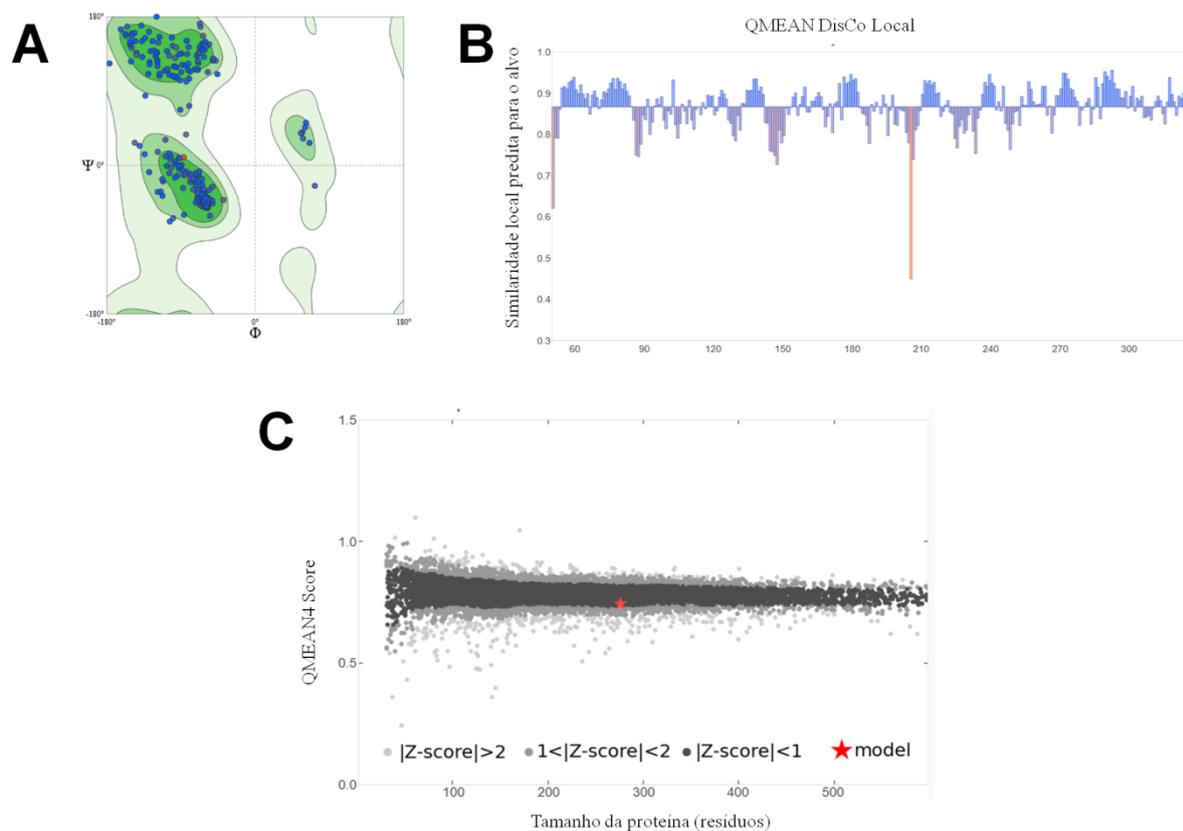
O veneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (Ls, 10 µg), recLoxtox s1A (s1A, 10 µg) e recLoxtox s11A (s11A, 10 µg) foram separados usando SDS-PAGE 12% em condições redutoras, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e expostos aos soros anti-recLoxtox s1A, anti-recLoxtox s11A, soro anti-recLoxtox s1A/s11A ou soro antiveneno de *L. similis* (Moenkhaus, 1898) diluído 1:5000. À esquerda, uma membrana representativa corada com Ponceau mostra o perfil das proteínas e os marcadores de peso molecular (MW).

Anexo 3 FIGURA A 3 Validação e análise de qualidade do modelos gerado para recLoxtox s1A



A) Gráfico Ramachandran gerado para o modelo da recLoxtox s1A, a análise indica que 98,19% dos resíduos encontram-se em regiões favoráveis. **B, C)** Análise QMEAN para o modelo da recLoxtox s1A mostrando a qualidade dos resíduos do modelo gerado. O resultado do QMEAN Global foi de $0,91 \pm 0.05$. Os dados foram obtidos por análises do programa MolProbity versão 4.4 disponibilizado pelo SWISS-MODEL.

Anexo 4 FIGURA A 4 Validação e análise de qualidade do modelos gerado para recLoxtox s11A



A) Gráfico Ramachandran gerado para o modelo da recLoxtox s1A, a análise indica que 95,64% dos resíduos encontram-se em regiões favoráveis. **B, C)** Análise QMEAN para o modelo da recLoxtox s1A mostrando a qualidade dos resíduos do modelo gerado. O resultado do QMEAN Global foi de $0,87 \pm 0.05$. Os dados foram obtidos por análises do programa MolProbity versão 4.4 disponibilizado pelo SWISS-MODEL.

Anexo 5 Trabalhos publicados durante o período de realização do doutorado

1. Kalapothakis, Yan; Miranda, Kelton; Pereira, Adriana Heloísa; Witt, Amanda S.A.; Marani, Camila; Martins, Ana Paula; **Leal, Hortênsia Gomes**; Campos-Júnior, Edimar; Pimenta, Adriano M.C.; Borges, Adolfo; Chávez-Olórtegui, Carlos; Kalapothakis, Evanguedes. Novel components of *Tityus serrulatus* venom: A transcriptomic approach. *Toxicon*, v.189, p.91 - 104, 2021. doi:10.1016/j.toxicon.2020.11.001

2. **Leal, Hortênsia Gomes**; Oliveira-Mendes, Bárbara Bruna Ribeiro de; Horta, Carolina Campolina Rebello; Pereira, Núbia Braga; Ferreira, Douglas Sales Medina; da Silva, Thais Soares; Biscoto, Gabriela Lago; Kalapothakis, Yan; Machado de Ávila, Ricardo A.; Chávez-Olórtegui, Carlos; Kalapothakis, Evanguedes. Molecular cloning and functional characterization of recombinant Loxtox from *Loxosceles similis* venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.164, p.1112 - 1123, 2020. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.190

3. **Leal, Hortênsia Gomes**, Stieglitz, K. A. Advancing Phospholipase D Enzymes as Diverse Drug Targets. In: Peter Grunwald. (Org.). *Pharmaceutical Biocatalysis*. 1ed. New York: Jenny Stanford Publishing, 2020, v. 1, p. 99-124. ISBN: 9781003045397.

4. Oliveira-Mendes, Bárbara Bruna Ribeiro de; Chatzaki, Maria; Sales-Medina, Douglas Ferreira; **Leal, Hortênsia Gomes**; Van der Veer, Ray; Biscoto, Gabriela Lago; Gonçalves, Priscila Mendes; Soares da Silva, Thais; Guerra-Duarte, Clara; Kalapothakis, Evanguedes; Horta, Carolina Campolina Rebello. From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: An overview focused on *Loxosceles similis*. *Toxicon*, v.173, p.5 - 19, 2020. doi:10.1016/j.toxicon.2019.11.002

5. Chagas, Aline Torres de Azevedo; Ludwig, Sandra; Pimentel, Juliana da Silva Martins; de Abreu, Nazaré Lúcio; Nunez-Rodriguez, Daniela Lidia; **Leal, Hortênsia Gomes**; Kalapothakis, Evanguedes. Use of complete mitochondrial genome sequences to identify barcoding markers for groups with low genetic distance. *Mitochondrial DNA Part A*, v.31, p.1 - 8, 2020. doi:10.1080/24701394.2020.1748609

6. Pimenta, Ricardo José Gonzaga; Brandão-Dias, Pedro Ferreira Pinto; **Leal, Hortênsia Gomes**; Carmo, Anderson Oliveira do; Oliveira-Mendes, Bárbara Bruna Ribeiro de; Chávez-Olórtegui, Carlos; Kalapothakis, Evanguedes. Selected to survive and kill: *Tityus serrulatus*, the Brazilian yellow scorpion. PLoS One, v.14, p.e0214075, 2019. doi:10.1371/journal.pone.0214075

7. Oliveira-Mendes, Bárbara Bruna Ribeiro de; Horta, Carolina Campolina Rebello; do Carmo, Anderson Oliveira; Biscoto, Gabriela Lago; Sales-Medina, Douglas Ferreira; **Leal, Hortênsia Gomes**; Brandão-Dias, Pedro Ferreira Pinto; Miranda, Sued Eustáquio Mendes; Aguiar, Carla Jeane; Cardoso, Valbert Nascimento; de Barros, André Luis Branco; Chávez-Olortégui, Carlos; Leite, M. Fátima; Kalapothakis, Evanguedes. CPP-Ts: a new intracellular calcium channel modulator and a promising tool for drug delivery in cancer cells. Scientific Reports, v.8, p.14739, 2018. doi:10.1038/s41598-018-33133-3