

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Raniele da Silva Moreira

**CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSILAÇÕES EM TOXINAS DO VENENO DE TRÊS
ESPÉCIES DE ARANHAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DO GÊNERO
*LOXOSCELES***

Belo Horizonte
2023

Raniele da Silva Moreira

**CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSILAÇÕES EM TOXINAS DO VENENO DE TRÊS
ESPÉCIES DE ARANHAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DO GÊNERO
*LOXOSCELES***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dr^a Liza Figueiredo Felicori Vilela

Coorientadora: Dr^a Marcella Nunes de Melo-Braga

**Belo Horizonte
2023**

043

Moreira, Raniele da Silva.

Caracterização de glicosilações em toxinas do veneno de três espécies de aranhas de importância médica do gênero *Loxosceles* [manuscrito] / Raniele da Silva Moreira. – 2023.

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

Orientadora: Profa. Dr^a Liza Figueiredo Felicori Vilela. Coorientadora: Dr^a Marcella Nunes de Melo-Braga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Venenos de Aranha. 3. Proteômica. 4. Processamento de Proteína Pós-Traducional. 5. Glicosilação. I. Vilela, Liza Figueiredo Felicori. II. Braga, Marcella Nunes de Melo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RANIELE DA SILVA MOREIRA. Aos vinte e sete dias do mês de janeiro de 2023 às 08:00 horas, reuniu-se de forma on line utilizando a plataforma "Zoom" e presencial, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização de glicosilações em toxinas do veneno de três espécies de aranhas de importância médica do gênero *Loxosceles*", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Liza Figueiredo Felicori Vilela, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Giuseppe Palmisano (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chávez Olortegui (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Marcella Nunes de Melo Braga - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada/mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2023.

Dr. Giuseppe Palmisano (Universidade de São Paulo)

Dr. Carlos Delfin Chávez Olortegui (UFMG)

Dra. Marcella Nunes de Melo Braga - Coorientador (UFMG)

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (UFMG)

Fabiola Mara Ribeiro

Profa. Fabiola Mara Ribeiro
 Coordenadora do Programa de Pós-graduação
 Em Bioquímica e Imunologia

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero dedicar essa dissertação aos meus avós. Ao meu avô Henrique por ter aprendido com seu pai, e repassado ao meu pai a importância da incansável busca pelo conhecimento e à minha avó Maria Clara por ter repassado a minha mãe e ambas terem me ensinado como usar esse conhecimento, sempre a favor do bem comum.

Agradeço a todos meus familiares, especialmente aos meus pais pela confiança, apoio e incentivo para chegar até aqui, onde apesar de sempre sonhar, nunca acreditei que estaria. Ao meu irmão, tias (os), primos (as), e amigos (as) por acreditarem em mim e por me permitir saber que apesar de certa ausência ao longo desse caminho, vocês estão sempre comigo. Agradeço vocês por serem meu ponto de paz, fortaleza, minha alavanca e ao mesmo tempo meus pés no chão.

Minha gratidão imensa também à família científica que ganhei. Desde meus primeiros passos na toxinologia com o grande professor Carlos Chávez Olórtégui e toda equipe do Labimq até meu atual momento com os Synbiomtes. Em especial agradeço à professora Liza Felicori por ter me dado essa imensa oportunidade de tê-la como orientadora e fazer parte dessa equipe. Você é uma inspiração de cientista, chefe, mulher, professora, enfim, um ícone (eterna fada acessível). Agradeço também por, além de ser um exemplo de orientação, ter me presenteado com uma co-orientadora de milhões! Sou imensamente grata à Dr^a Marcella Melo-Braga por me ensinar tanto! Por ser extremamente presente e querida em todas as etapas, para comemorar nos momentos felizes e para incentivar nos não tão felizes assim. O apoio e o carinho de vocês duas me fez e faz querer sempre continuar!

Ainda sobre a equipe do Synbiom, agradeço também pelas parcerias e amizades formadas. A todos (as) vocês que estão na maior parte do meu dia a dia e mesmo fora do laboratório, é com vocês também que eu adoro estar. Em especial à Marcele, Regina e Laís por termos fortalecido ainda mais os nossos laços com os projetos do IDEA e por me escutarem tanto e serem ombro amigo. Manu e Carlina por inspirarem força e motivação sempre, o famoso ‘Dio bom’ era o mais esperado após cada experimento. Agradeço também ao Bruno por ter dado início a esse projeto que me encantou desde o primeiro momento. E a todos demais por momentos incríveis que vivenciamos.

Meus agradecimentos também aos laboratórios parceiros que contribuíram com esse projeto, cederam espaços, reagentes e equipamentos. Especialmente à professora Héli da Monteiro por, além do empréstimo dos equipamentos, ter se disposto a despender seu valioso tempo e conhecimentos para me auxiliar nos eternos géis bidimensionais. Ao professor Carlos Chávez e ao Labimq por toda ajuda, e também por sempre estar disposto a cooperar. E também ao Franck Molina pela parceria, incentivo e brilhantes ideias. Vocês são grandes exemplos para mim!

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo amparo, financiamento deste projeto e pela bolsa concedida. Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do ICB/UFMG pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa e pelo compartilhamento de conhecimentos ao longo do curso. Agradeço à banca pelo aceite do convite, disposição em participar deste momento e pela contribuição.

Finalizo esses agradecimentos lembrando desta, ainda pequena, caminhada pro meu sonho, que começou ao iniciar o curso de Ciências biológicas em 2016, e se estendeu ao ingressar no mestrado em 2020. Foram anos difíceis, sucateamento das universidades, negacionismo científico, (ainda mais) desvalorização da educação, perdas de pessoas queridas, novas descobertas sobre mim... Porém finalizo mais essa etapa vendo nascer a esperança e com a mesma motivação da criança que um dia disse que queria ser cientista e permanece inspirada em umas das mais célebres profissionais nesse ramo que o mundo já teve, Marie Curie, a quem também agradeço pela frase que guia esse meu sonho: “Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”.

Boa leitura!

Resumo

O loxoscelismo, sintomatologia causada pelo envenenamento por aranhas *Loxosceles*, é um problema de saúde pública no Brasil atingindo cerca de 8 mil vítimas por ano. Apesar do avanço na caracterização das toxinas destes venenos, pouco se sabe sobre o papel de modificações pós-traducionais (PTMs) e sua relação com a fisiopatologia do envenenamento. Dentre as PTMs, a glicosilação é uma das mais frequentemente presentes em proteínas animais e sua presença está relacionada, entre outras, com a estabilidade, solubilidade, interação celular e molecular de proteínas. Dado à sua importância e às escassas evidências experimentais da presença e papel destas PTMs em toxinas de artrópodes, nosso grupo se propõe, neste trabalho, a investigar a predominância e características desta modificação em toxinas do veneno de *Loxosceles*. A fim de ter uma visão geral da presença das glicoproteínas no veneno, através de eletroforese bidimensional corada por um corante glicospecífico (ProQ Emerald), vimos que de 17 a 43% dos spots na faixa molecular de importantes proteínas com atividade biológica no envenenamento, como fosfolipases D, metaloproteases e hialuronidases foram marcados como glicosilados com diferentes perfis nas três espécies estudadas. Além disso, ao utilizar um ensaio de lectina ligada a enzima a fim de verificar a reatividade dos venenos pelas mesmas, foi observada a reatividade com ConA, PNA, DBA, e SNA sugerindo a presença de N- e O-glicosilações. Essa presença foi confirmada pela análise de peptídeos glicosilados, obtidos por glicoproteômica bottom-up, contra o banco de sequências customizado pelo nosso grupo, utilizando o software Byonic. Considerando as 3 espécies, 100 sequências sem redundância de peptídeos N- e O-glicosilados foram encontradas em proteínas, como serino e metaloproteases, e fosfolipases D e A2. Esses sítios de glicosilação podem conter de 1 a 22 glicofomas não redundantes. As estruturas de N-glicosilações encontradas foram em sua maioria paucimanoses, contudo também foi observada a presença de oligomanoses e estruturas complexas/híbridas. Esses achados são uma importante contribuição para o atual conhecimento sobre essas moléculas e indicam a importância das glicosilações nesta peçonha e abrem questionamentos a respeito de seu papel no desfecho do loxoscelismo.

Palavras-chave: *Loxosceles*; Proteínas; PTMs; Glicosilação; Proteômica.

Abstract

Loxoscelism, symptomatology envenomation by *Loxosceles* spiders, is a public health issue in Brazil, affecting around 8,000 victims annually. Despite advances in the characterization of the toxins of these venoms, little is known about the role of post-translational modifications (PTMs) and their relationship with the pathophysiology of envenomation. Among PTMs, glycosylation is one of the most frequently present in animal proteins, and its presence is related, among others, to the stability, solubility, cellular and molecular interaction of proteins. Given their importance and the scarce experimental evidence of the presence and role of these PTMs in arthropod toxins, our group proposes, in this work, to investigate the predominance and characteristics of this modification in *Loxosceles* venom toxins. In order to have an overview of the presence of glycoproteins in the venom, through two-dimensional electrophoresis stained with a glycospecific dye (ProQ Emerald), we saw that from 17 to 43% of the spots in the molecular range of essential proteins with biological activity in envenomation, such as phospholipases D, metalloproteases and hyaluronidases were marked as glycosylated with different profiles in the three studied species. Furthermore, when using an Enzyme-linked lectin assay in order to verify the reactivity of the venoms by them, reactivity with ConA, PNA, DBA, and SNA was observed, suggesting the presence of N- and O-linked glycosylations. This presence was confirmed by the analysis of glycosylated peptides, obtained by bottom-up glycoproteomics, against the sequence bank, customized by our group, using the Byonic software. Considering the three species, 100 sequences without redundancy of N- and O-linked glycosylated peptides were found in proteins, such as serine and metalloproteases, and phospholipases D and A2. These glycosylation sites can contain from 1 to 22 non-redundant glycoforms. The N-linked glycosylation structures found were mostly paucimannose, however, the presence of oligomannose and complex/hybrid structures was also observed. These findings contribute to the current knowledge about these molecules, indicating the importance of glycosylations in this venom and raising questions about their role in the outcome of loxoscelism.

Keywords: *Loxosceles*; Proteins; PTMs; Glycosilation; Proteomics.

Lista de Figuras

Figura 1 - Aranha do gênero <i>Loxosceles</i>	13
Figura 2 - Manifestação cutânea do loxoscelismo.....	16
Figura 3 - Transcriptoma da glândula de veneno de <i>L. laeta e intermedia</i>	17
Figura 4 - Proteínas do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> e suas funções.....	20
Figura 5 - Principais classes de N-glicanos de mamíferos.....	23
Figura 6 - Esquema da metodologia de glicoproteômica dos venenos de aranhas <i>Loxosceles</i>	36
Figura 7 - Padronização da quantidade de veneno no gel 2D.....	37
Figura 8 - Perfil (glico)proteômico do veneno de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> por gel bidimensional (2DE).....	40
Figura 9 - Ensaio de lectina ligado a enzima para detecção de carboidratos em venenos de <i>Loxosceles</i>	42
Figura 10 - Sequências de peptídeos glicosilados exclusivos e compartilhados entre as espécies de <i>Loxosceles</i>	49
Figura 11 - Análise qualitativa do glicoproteoma do veneno de <i>Loxosceles</i>	54
Figura 12 - Número de estruturas de N-glicosilações por sequência de peptídeo nos venenos de <i>Loxosceles</i>	56
Figura 13 - Classificação das estruturas de N-glicosilações encontradas nas 3 espécies de <i>Loxosceles</i>	58
Figura 14 - Estruturas de N-glicosilações encontradas nas principais proteínas com atividade biológica no envenenamento de <i>Loxosceles</i>	62

Lista de tabelas

Tabela 1 - Configuração da isoeletrofocalização (IEF).....	38
Tabela 2 - Peptídeos N-glicosilados nos venenos das 3 espécies de <i>Loxosceles</i>	46
Tabela 3 - Peptídeos O-glicosilados nos venenos das 3 espécies de <i>Loxosceles</i>	48

Lista de abreviaturas e siglas

2DE: Eletroforese bidimensional

ACN: Acetonitrila

BSA: Albumina sérica bovina

CPPI: Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos

DBA: Dolichos biflorus agglutinin

DTT: Ditioneitol

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

ELLA: Ensaio de lectina ligado a enzima (do inglês, Enzyme-linked lectin assay)

HILIC: Cromatografia líquida de interação hidrofílica (do inglês, Hydrophilic interaction liquid chromatography)

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

HRP: Peroxidase de rábano (do inglês, horseradish peroxidase)

IAA: Iodoacetamida

IEF: Isoeletrofocalização

kDa: Quilodalton

LC: Cromatografia líquida

MALII: Maackia Amurensis Lectin II

MS: Espectrometria de massa

PBS: Tampão fosfato salino (do inglês, phosphate buffered saline)

PBS: Tampão fosfato-salino

PEP2D: Probabilidade de erro posterior sensível à proteína (do inglês, Protein-aware posterior error probability)

PNA: Arachis hypogaea (peanut) agglutinin

PTM: Modificações pós-traducionais (do inglês, post-translational modifications)

RCA: Ricinus communis agglutinin

SaLox: Soro anti-loxoscélico

SBA: Glycine max (soybean) agglutinin

SNA: Sambucus Nigra Lectin

TEAB: Bicarbonato trietilamônio (do inglês, triethylammonium bicarbonate)

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

UEA I: Ulex europaeus agglutinin I

WGA: Triticum vulgare (wheat germ) agglutinin

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	13
1.2 Loxoscelismo: Aspectos da doença, diagnóstico e tratamento	14
1.3 Composição do veneno	16
1.4 Modificações pós-traducionais em toxinas de artrópodes	20
1.4.1 Glicosilação em proteínas do veneno de artrópodes	22
1.5 Técnicas e métodos de identificação de glicoproteínas	25
1.6 Importância do desenvolvimento do projeto	28
2. OBJETIVO	30
2.1 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Obtenção dos venenos	30
3.2 Quantificação das proteínas dos venenos	30
3.3 Eletroforese bidimensional (2DE)	31
3.3.1 Preparação da amostra	31
3.3.2 Reidratação passiva da Strip	31
3.3.3 Primeira dimensão - Isoeletrofocalização (IEF)	32
3.3.4 Equilíbrio da Strip - Redução e alquilação	32
3.3.5 Segunda dimensão - SDS-PAGE	32
3.3.6 Coloração	33
3.3.7 Análise quantitativa dos géis	34
3.4 Ensaio de lectina ligado a enzima para detecção de carboidrato	34
3.5 Análise de dados de glicoproteômica de veneno de <i>Loxosceles</i>	35
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Perfil glicoproteômico do veneno de três espécies de <i>Loxosceles</i>	37
4.2 Detecção de diferentes tipos de carboidratos no veneno de <i>Loxosceles</i>	41
4.3 Glicoproteômica	43
4.3.1 Identificação de glicopeptídeos encontrados nos venenos.	43
4.3.2 Sequências de peptídeos glicosilados referente a diversas proteínas com atividade biológica no envenenamento.	49
4.3.3 Caracterização da complexidade das estruturas de N-glicosilações	55
5- CONCLUSÃO	64
6- PERSPECTIVAS	64
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1.INTRODUÇÃO

1.1.Aranhas do gênero *Loxosceles*

Popularmente conhecidas como aranha-marrom, aranha-violino ou brown recluse, as aranhas do gênero *Loxosceles*, identificadas em 1832 por Heineken e Lowe, estão distribuídas em todo o mundo (WORLD SPIDER CATALOG, 2022). Pertencentes à família Sicariidae, as aranhas deste gênero são pequenas, com corpo de 1 a 3 cm, mas com patas longas. Os nomes populares se baseiam em suas principais características como coloração amarronzada com diferentes tonalidades entre as espécies, e a presença de uma mancha em formato de violino no dorso do cefalotórax (figura 1A). Entretanto, sua principal característica para identificação são os três pares de olhos dispostos em um semicírculo (PETERSON, 2006), pois apenas aranhas dos gêneros *Loxosceles*, *Sicarius* e *Scytodes* possuem três pares de olhos (figura 1B) (SWANSON; VETTER, 2006) enquanto a maioria das aranhas possui oito olhos.

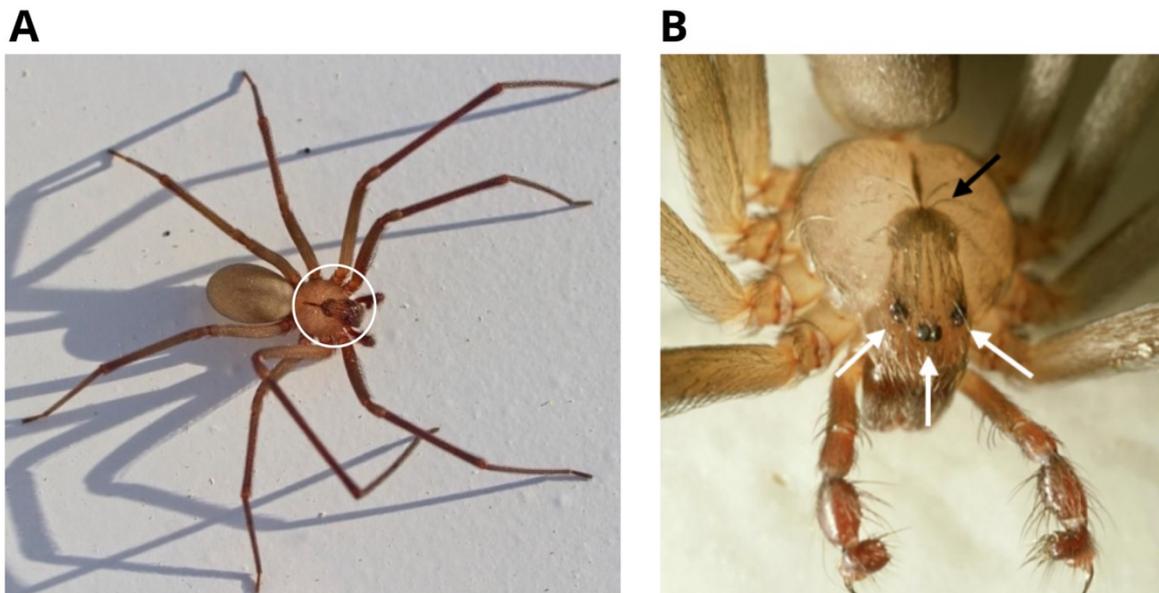


Figura 1 – Aranha do gênero *Loxosceles*. (A) Coloração marrom e a mancha em formato de violino no cefalotórax (círculo branco) (retirado de rentokil.com). (B) Destaque da mancha em formato de violino (seta preta) e os 6 olhos dispostos em semicírculo em 3 pares (setas brancas) (imagem adaptada de Getty Images).

As aranhas do gênero *Loxosceles* possuem hábitos noturnos e se abrigam, quando em ambiente natural, embaixo de rochas e troncos, sendo muito encontradas em cavernas. Porém, estão também amplamente presentes em ambientes antrópicos,

podendo estar escondidas em sapatos, roupas de cama, quadros e móveis (FUTRELL, 1992; GERTSCH, 1967). Possuem uma alimentação baseada em pequenos insetos e não são consideradas como agressivas, mordendo apenas quando se sentem ameaçadas, ou são pressionadas por acidente (FUTRELL, 1992; RUSSELL; WALDRON; MADON, 1969).

Dado o avanço da urbanização nas cidades, e a capacidade das aranhas-marrom de sobrevivência e adaptação a diferentes ambientes (APPEL et al., 2005), cada vez há mais relatos da presença desses animais em ambientes urbanos e conseqüentemente o aumento do número de acidentes. No Brasil, apesar de serem encontradas em todo país, as regiões com mais casos reportados são as mais populosas e urbanizadas, Sul com em média 7 mil casos e Sudeste com aproximadamente mil casos notificados por ano, enquanto no Brasil inteiro, tem em média 8600 casos (SAÚDE., 2021). Das 19 espécies descritas no país, as 3 principais de importância médica, ou seja, que estão envolvidas nos acidentes com humanos, são a *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (COUTINHO et al., 2014; HUBICHE; DELAUNAY; DEL GIUDICE, 2013; ISBISTER; FAN, 2011; MÁLAQUE et al., 2002; OLIVEIRA-MENDES et al., 2020; PEZZI et al., 2016; TAMBOURGI et al., 2004; WORLD SPIDER CATALOG, 2022; ZAMANI; RAFINEJAD, 2014)

1.2 Loxoscelismo: Aspectos da doença, diagnóstico e tratamento

Considerado um grave problema de saúde pública no Brasil, os sinais clínicos causados pelo envenenamento das aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidos como loxoscelismo. A principal dificuldade de identificação da ocorrência do envenenamento se dá pelo fato da mordida das aranhas-marrom ser relativamente indolor. No entanto, a manifestação de dor e queimação leve a moderada começa após 2 a 8 horas do acidente (SWANSON; VETTER, 2006). Após 12h a 24h da mordida, sinais mais graves como edema, formação de bolhas, eritema e equimose começam a aparecer, e geralmente é quando a maioria das vítimas vão procurar atendimento. No Brasil, não há até o momento um exame específico disponível comercialmente para o diagnóstico do loxoscelismo, portanto este é pautado nas características clínicas e epidemiológicas apresentadas pela vítima.

Dentre essas características clínicas, as mais comuns são as manifestações cutâneas (Figura 2), que podem evoluir chegando ao sintoma clássico de modidas por *Loxosceles*, a dermonecrose (BARRETTO; CARDOSO; DE CILLO, 1985; FUTRELL, 1992). Alguns casos (~1 a 27%) evoluem para o quadro sistêmico, ou cutâneo-visceral, que além da lesão necrótica na pele, o paciente pode desenvolver insuficiência renal, hemólise intravascular e convulsões (CHAIM et al., 2006; DA SILVA et al., 2004; FUTRELL, 1992).

O tratamento para os casos de loxoscelismo utilizado atualmente depende da gravidade da doença, que pode ser estimada por exames laboratoriais não específicos, e características clínicas (FRANÇA; BARBARO; ABDULKADER, 2002; MALAQUE et al., 2011). Não há um consenso terapêutico em todo o mundo, mas no Brasil, para casos leves, geralmente ocorre a administração de analgésicos, anti-histamínicos e corticosteróides. Já em casos moderados e graves, é utilizado no Brasil, e em alguns outros países da América latina, o antiveneno (SAMS et al., 2001; SAÚDE., 2001). Atualmente há disponível no Brasil dois soros para o tratamento: o soro antiloxoscélico (SALox) produzido pelo CPPI, com indicação específica para acidente com as aranhas do gênero *Loxosceles* e o antiaracnídico (SAA) produzido pelo Instituto Butantan indicado para o tratamento de acidentes por aranhas dos gêneros *Loxosceles* e *Phoneutria* (aranha armadeira), e escorpiões do gênero *Tityus* (escorpião-amarelo) (SAÚDE., 2017). Contudo, a eficácia da soroterapia é ainda muito debatida na literatura, dada algumas importantes limitações como a variabilidade de imunogenicidade, reações adversas e a diminuição de eficácia após 48h da mordida, tempo que às vezes é insuficiente para os pacientes procurarem atendimento e terem o diagnóstico correto (DA SILVA et al., 2004; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; ISBISTER et al., 2003; ISBISTER; FAN, 2011; LOPES et al., 2020; PAULI et al., 2009).

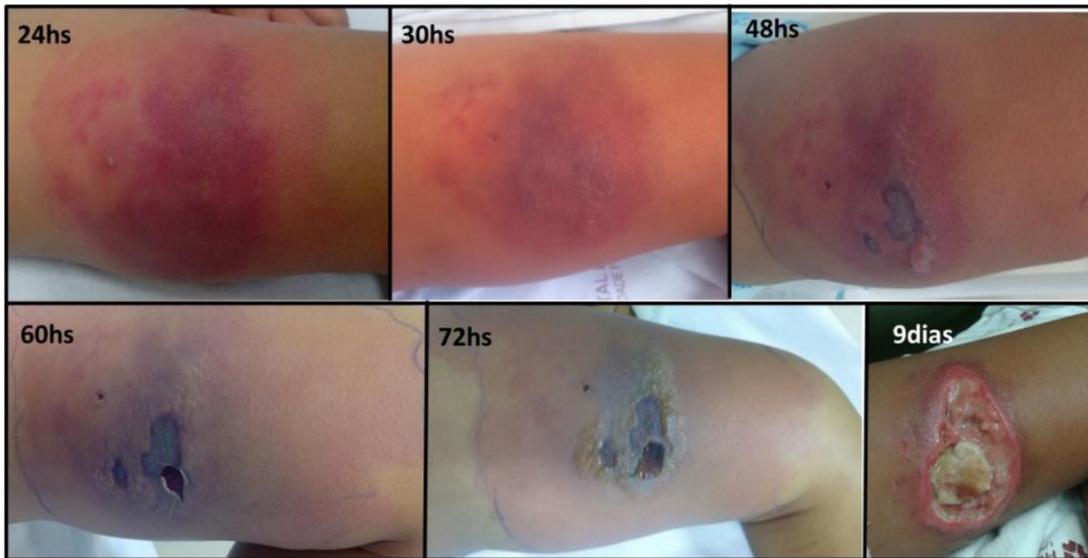


Figura 2: Manifestação cutânea do loxoscelismo. Evolução da manifestação cutânea do loxoscelismo em membro de paciente pediátrico. A lesão 24h pós-mordida é caracterizada por edema, eritema e hematoma extenso. Após 48h é possível observar a formação da dermonecrose, intensa atividade hemolítica que evoluiu e expandiu com o tempo. Nesse caso houve extenso dano tecidual que se prolongou por mais de 9 dias (SILVA, 2019).

1.3 Composição do veneno

O veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* é um complexo de biomoléculas que pode variar conforme sexo, idade, espécie, habitat, nutrição e tamanho do indivíduo (revisado por GREMSKI *et al.*, 2014). Os constituintes do veneno possuem diversas propriedades biológicas que atuam em uma série de moléculas específicas e inespecíficas com o principal objetivo de imobilizar e capturar suas presas, que são principalmente insetos (RASH; HODGSON, 2002), o que justifica grande parte do transcrito da glândula de veneno ser composto de toxinas inseticidas (LiTx 1, 2, 3 e 4) (GREMSKI *et al.*, 2010) (Figura 3). Porém, além da predação, as aranhas-marrom também utilizam o veneno para sua defesa, e em casos de acidentes com humanos, as toxinas que compõem o veneno têm grande importância nas manifestações clínicas do loxoscelismo citadas anteriormente. A gravidade dessas manifestações clínicas pode variar geograficamente e conforme a espécie de *Loxosceles* responsável pela mordida (ABDULKADER *et al.*, 2008; BARBARO; CARDOSO, 2003; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; ISBISTER; FAN, 2011). Por isso, vários grupos se empenharam no estudo da composição do veneno de cada espécie de importância médica.

A primeira análise do transcriptoma do gênero *Loxosceles* foi reportada por Fernandes-Pedrosa e colaboradores em 2008. Utilizando a estratégia “*Expressed Sequence Tags (EST)*” e sequenciamento de Sanger, fizeram um estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* brasileira. Em 2010, Gremski e colaboradores sequenciaram ESTs de uma biblioteca de cDNA construída a partir de glândulas de veneno de *L. intermedia*. Como é possível observar na Figura 3, a principal diferença no perfil do transcriptoma do *L. intermedia* para o de *L. laeta* foi a descrição de toxinas da família LiTx que se encontra em maior abundância no veneno de *L. intermedia* seguida pelas Fosfolipases D ou esfingomielinases D presente em ambas as análises com pouca diferença na expressão, 16,3% em *L. laeta* (Figura 3A) e 20,2% em *L. intermedia* (Figura 3B). Metaloproteases também foram encontradas em ambos os transcritos com uma diferença significativa de proporção, 22,6% em *L. intermedia* e 8,2% em *L. laeta*. Já em menor porcentagem, mas com grande importância descrita no envenenamento por animais peçonhentos, foram observadas a presença de hialuronidases e serino-proteases (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008; GREMSKI et al., 2010) (Figura 3).

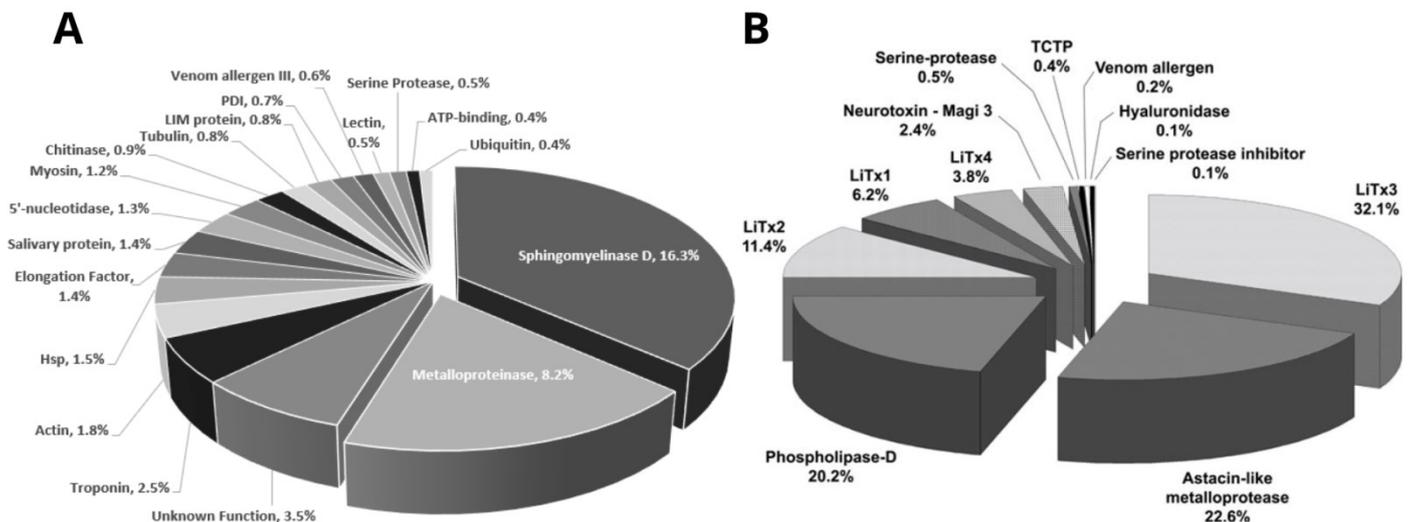


Figura 3 - Transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* e *intermedia*. Proporções relativas dos grupos de toxinas sobre o total de transcritos da glândula de veneno de A) *Loxosceles laeta* (adaptado de (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008) e B) *Loxosceles intermedia* (GREMSKI et al., 2010).

Estudos do transcriptoma de outras espécies de *Loxosceles*, como a *L. laeta* peruana, e *Loxosceles similis* também foram relatados utilizando a abordagem RNAseq-Sequenciamento de nova geração (NGS) apontando para perfil semelhante de grande abundância de fosfolipases D e metaloproteases, mesmo com algumas diferenças de proporção (DANTAS et al., 2016; MEDINA-SANTOS et al., 2019, 2022). Medina-Santos e colaboradores em 2022 também avaliaram algumas atividades, como a hialuronidásica e proteolítica, observando algumas diferenças entre as espécies *L. laeta* brasileira e peruana.

As fosfolipases D (PLDs) são as principais responsáveis pela atividade dermonecrótica, característica clássica das manifestações cutâneas do loxoscelismo (TAMBOURGI et al., 1998). Essa enzima possui massa molecular entre 30-35 kDa e faz parte de um grupo de hidrolases fosfodiéster, cuja função está relacionada ao metabolismo de lipídios (GREMSKI et al., 2014; LEE; LYNCH, 2005; RIVERA et al., 2015). As PLDs possuem diferentes proteoformas, que podem variar conforme a espécie e no efeito no envenenamento, pois apesar de apresentarem muitos aminoácidos conservados, o que justifica os perfis bioquímicos e farmacológicos semelhantes, há grupos de proteoformas com diferentes atividades esfingomielinásicas e hemolíticas entre elas (DANTAS et al., 2016; GREMSKI et al., 2014). Também fundamentais na evolução do quadro do envenenamento estão as metaloproteases. Essas enzimas fazem parte da família das proteases semelhantes à astacina e são consideradas endopeptidases que possuem ação fibrinogenolítica e gelatinolítica (FEITOSA et al., 1998) pois atuam na clivagem de fibras de colágeno, fibronectina e laminina, dentre outros componentes da matriz extracelular. Desse modo, auxiliam principalmente na propagação da lesão e foi relatado uma possível influência na disseminação sistêmica de outras toxinas nas vítimas (DA SILVEIRA et al., 2007; TREVISAN-SILVA et al., 2010).

Também pertencente à família das enzimas proteolíticas, estão as serinoproteases, em menor proporção nos transcritos no veneno *Loxosceles* (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008; GREMSKI et al., 2010), e assim como outras proteases, têm uma contribuição na atividade gelatinolítica. Essas enzimas podem atuar na destruição tecidual local e interferir na coagulação sanguínea e na fibrinólise por possivelmente promoverem ações secundárias específicas como complementação

e/ou ativação de outras toxinas (DEVARAJA et al., 2010; KINI, 2006; VEIGA et al., 2000).

Outra importante proteína pouco expressa no transcriptoma de aranhas-marrom é a hialuronidase, que desempenha principalmente a função de difundir o veneno (GIRISH et al., 2004; KREIL, 1995). Atuam degradando o ácido hialurônico, composto amplamente presente na matriz extracelular de vertebrados. Desse modo, reduz a rigidez da matriz extracelular e provoca aumento de sua permeabilidade (FERRER et al., 2013; NAGARAJU; DEVARAJA; KEMPARAJU, 2007).

Além dessas proteínas, estão envolvidas na toxicidade do veneno diversas outras biomoléculas, como alérgenos, fatores de inflamação, outras proteases e, também as fosfolipases A2 (PLA2). Embora pouco relacionada ao envenenamento por *Loxosceles*, as PLA2 em geral estão envolvidas na liberação de componentes que induzem uma série de respostas patológicas, incluindo processos pró-inflamatórios, agregação plaquetária e hiperpermeabilidade endotelial (FUTRELL, 1992; WRIGHT et al., 1973) e foi identificada por dos Santos e colaboradores em 2009, através de uma abordagem proteômica, no veneno de aranhas deste gênero. Além disso, propuseram um mecanismo de ação multifatorial do veneno de *Loxosceles* incluindo as fosfolipases A2 com possível envolvimento nas alterações do fluxo sanguíneo que podem resultar em edema e isquemia, e juntamente com outros fatores inflamatórios, peptidases e lipases foi proposto que podem contribuir também para a evolução dos quadros sistêmicos, principalmente nos rins (DOS SANTOS et al., 2009). Contudo, testes de atividade dessa classe enzimática no veneno ainda não possuem dados suficientes para compreender melhor seu envolvimento no envenenamento por *Loxosceles*, assim como já foi demonstrado para venenos de diferentes espécies de serpentes (FULY et al., 2007; STRAUCH et al., 2013).

Diante da complexidade que essas toxinas apresentam, é um grande desafio caracterizar e elucidar os aspectos moleculares do envenenamento. Ao longo dos anos, grupos de pesquisa têm se empenhado para compreender melhor os componentes proteicos presentes nas toxinas animais, sobretudo aquelas de importância médica (GREMSKI et al., 2014). Tanto estudos de transcriptômica quanto de proteômica corroboram a presença dessas proteínas citadas em

diferentes espécies de *Loxosceles* com expressões distintas entre elas (DOS SANTOS et al., 2009; FERNANDES-PEDROSA et al., 2008; GREMSKI et al., 2010; MACHADO et al., 2005; MEDINA-SANTOS et al., 2022; MORGON et al., 2016; TREVISAN-SILVA et al., 2017) Um esquema geral sobre as principais toxinas envolvidas no envenenamento por *Loxosceles* e seus prováveis efeitos pode ser visto na Figura 4.

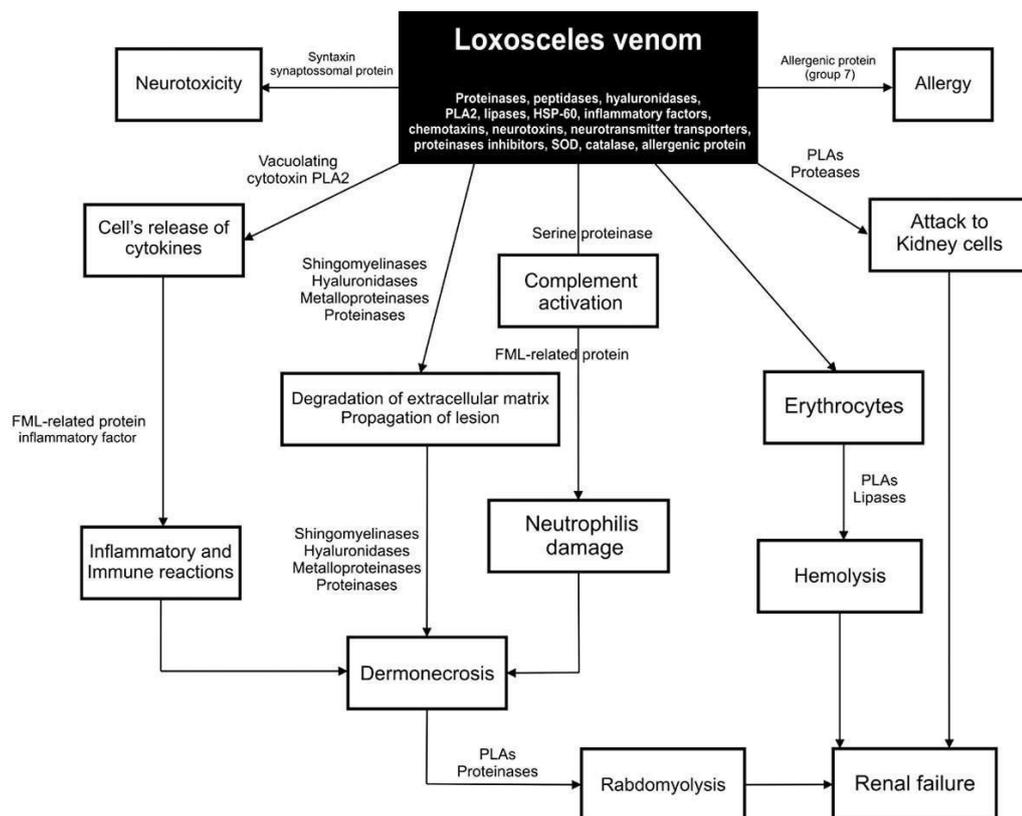


Figura 4- Proteínas do veneno de *Loxosceles intermedia* e suas funções. Esquema que apresenta os principais efeitos do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* e as proteínas que podem estar envolvidas nos diferentes mecanismos que levam aos quadros cutâneo e cutâneo-visceral do loxoscelismo (DOS SANTOS et al., 2009).

1.4 Modificações pós-traducionais em toxinas de artrópodes

A diversidade de toxinas presentes nestes venenos é responsável pela fisiopatologia do envenenamento. Essa diversidade pode ser ainda maior devido às modificações pós-traducionais, pois esta contribui para o aumento da complexidade molecular de proteínas no geral, o que pode impactar em sua função (WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005).

As modificações pós-traducionais (PTMs, sigla em inglês) são modificações que ocorrem após ou durante o processo de tradução. São caracterizadas pela remoção de um ou mais aminoácidos do grupo amino-terminal, adição ou remoção de grupos químicos ou biomoléculas a certos resíduos de aminoácido e clivagem proteolítica (HOSSAIN, 2020). As PTMs são amplamente conhecidas pela sua função reguladora das características físico-químicas das proteínas, modulando suas funções e interações. Essas modificações têm grande importância na manutenção da integridade celular, e em alguns casos possuem um mecanismo protetor contra proteólise, uma vez que conferem maior estabilidade proteica e também mascaram sítios de clivagem (WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005). Contudo, a presença de PTMs ainda é pouco explorada na toxilogia, mas diante das diversas funções que desempenham, é muito relevante para compreensão da base molecular do envenenamento.

Dentre as mais de 300 PTMs conhecidas com possível relevância biológica, a amidação e ligação dissulfeto são as mais exploradas e bem caracterizadas em venenos de artrópodes (DE MELO-BRAGA et al., 2022). Essas modificações estão envolvidas na modulação da afinidade de importantes proteínas de escorpiões para canais iônicos dependentes de voltagem como de sódio e potássio, afetando na potência e toxicidade do veneno e na estabilidade da conformação tridimensional dessas proteínas (BENKHADIR et al., 2004; PINEDA et al., 2020; ZHU et al., 2002). Contudo, há diversas outras PTMs, muito frequente em proteínas animais, mas muito pouco estudadas ou descritas em proteínas de venenos de artrópodes anotadas no UniProtKB/Swiss-Prot. A glicosilação é um exemplo de PTM muito importante e frequente. Khouri e colaboradores em 2011 demonstraram que essa é a modificação pós-traducional com dados putativos descritos com maior frequência no UniProtKB/Swiss-Prot e a 3ª mais frequente baseada em dados experimentais (KHOURY; BALIBAN; FLOUDAS, 2011). Além disso, a ocorrência da glicosilação é essencial para diversos processos estruturais e funcionais em proteínas, como enovelamento, estabilidade, solubilidade, atividade e especificidade enzimática, proteção contra proteases, e até mesmo pode impactar na sobrevivência em alguns organismos multicelulares se retirado os glicocjugados em um estágio inicial de desenvolvimento (TAYLOR, MAUREEN E. DRICKAMER, 2011).

1.4.1 Glicosilação em proteínas do veneno de artrópodes

A glicosilação é uma das PTMs mais complexas, que se caracteriza pela adição de unidades de carboidratos à cadeia lateral de resíduos de aminoácidos específicos em proteínas. Existem diferentes tipos de glicosilações, sendo as mais comuns as N- e O-glicosilações.

Na N-glicosilação, os carboidratos (ou glicanos) estão ligados covalentemente ao átomo de nitrogênio amídico na cadeia lateral da asparagina, na sequência consenso NXT/S (onde N é asparagina, X é qualquer aminoácido exceto prolina, T é treonina e S é serina) (GAVEL; HEIJNE, 1990). Entretanto, nem todos os sítios putativos observados na sequência de aminoácido serão glicosilados, pois depende de outros aspectos como, por exemplo, o tipo de célula que a proteína é expressa e de sua estrutura.

A biossíntese da N-glicosilação se inicia com a construção de um glicano precursor que será carregado, ao final de um longo processo envolvendo enzimas, por um transportador lipídico, contido no retículo endoplasmático (RE) (BURDA; AEBI, 1999). No RE também vão ocorrer algumas modificações como a adição de um grupo GlcNAc para formar o núcleo da quitobiose, uma característica de todos N-glicanos eucarióticos, e posterior extensões desse núcleo envolvendo adição de resíduos de manose. Uma vez que o precursor se liga a um complexo oligoasacariltransferase (OST), o processamento da N-glicoproteína prossegue sofrendo a ação de glicosidases que clivam resíduos de glicose até que as N-glicoproteínas devidamente dobradas são exportadas para o Golgi, onde os N-glicanos são processados em oligomanoses, paucimanose ou glicanos complexos e híbridos (Figura 5) (SCHACHTER, 2009; WALSKI et al., 2017). Os dois primeiros são os mais comumente encontrados em invertebrados e representam mais de 90% de todos os N-glicanos identificados em insetos (AOKI et al., 2008; FABINI et al., 2001; LÉONARD et al., 2006; SARKAR et al., 2006), enquanto que, quantidades muito maiores de N-glicanos complexos estão presentes em vertebrados (SCHACHTER, 2009). Para a maioria das N-glicoproteínas, termina nesta fase o processamento dos glicanos, eles estão prontos para serem entregues às organelas, membrana plasmática ou ser secretada pela célula.

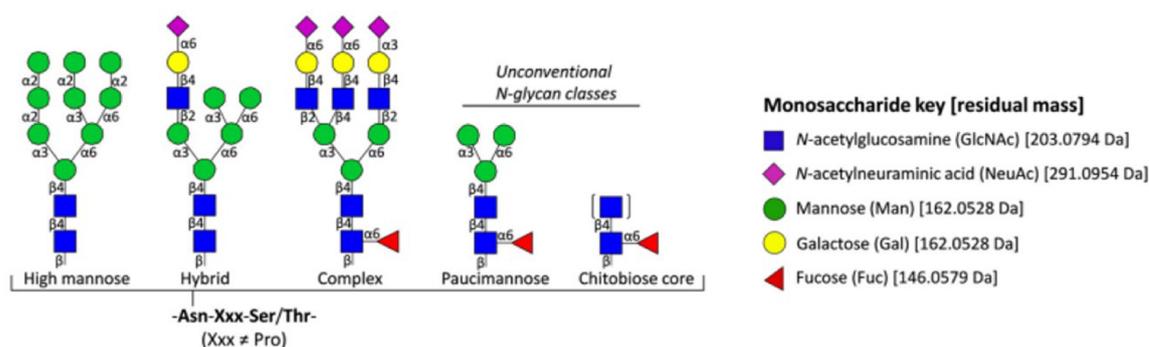


Figura 5- Principais classes de N-glicanos de mamíferos. Divisão das classes de N-glicanos mais frequentes em N-glicoproteínas de mamíferos. As 3 classes principais são: ricos em manose, complexos e híbridos. N-glicanos do tipo paucimanose e de núcleo quitobiose não são convencionais em células de mamífero, mas muito comumente encontrados em insetos. Ao lado está representado os resíduos de monossacarídeos, seus símbolos e massas monoisotópicas residuais fornecidas (THAYSEN-ANDERSEN; PACKER; SCHULZ, 2016).

Enquanto que a O-glicosilação é iniciada pela ligação de uma única molécula de glicano ao átomo de oxigênio na cadeia lateral de serina ou treonina em uma cadeia polipeptídica. Essa ligação acontece no Golgi frequentemente pela adição de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a polipeptídeos recentemente traduzidos. A GalNAc ligada ao peptídeo pode ser ainda estendida com resíduos de galactose (Gal) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) e resulta na síntese de diferentes estruturas centrais de O-glicanos. Em insetos, o primeiro carboidrato pode ser ainda estendido de forma gradual para formar cadeias de oligossacarídeos que consistem geralmente em até quatro resíduos, mas também são possíveis glicanos mais elaborados (AOKI et al., 2008; GAUNITZ et al., 2013).

Apesar de ser uma das PTMs mais frequentemente descritas no UniProtKB/Swiss-Prot em outros organismos (KHOURY; BALIBAN; FLOUDAS, 2011), há muito poucos dados de glicosilação no veneno de artrópodes, com um total de apenas 118 entradas (DE MELO-BRAGA et al., 2022). Destas entradas, 83% são dados putativos, sendo que a maioria é de N-glicosilações baseada na presença da sequência consenso (NxT/S) e apenas 9% possuem evidências experimentais (DE MELO-BRAGA et al., 2022). Dentre os poucos dados experimentais, N-glicosilações

e O-glicosilações foram caracterizadas em toxinas de animais como vespas, abelhas e escorpiões.

Em vespas, o principal componente alergênico, o Antígeno 5, e outras proteínas como fosfolipases A1 e hialuronidases foram identificados com possíveis sítios de glicosilação e em alguns casos houve a confirmação por gel bidimensional e análise LC-MS/MS. Embora o papel dessas modificações em algumas dessas toxinas ainda não esteja elucidado, foi proposto que poderiam constituir determinantes imunogênicos secundários para IgE e contribuir para solubilidade, estabilidade e resistência às proteases (DOS SANTOS-PINTO et al., 2014; MONSALVE et al., 2020). Diversas proteínas como outras fosfolipases A2 e neurotoxinas de diferentes espécies de escorpiões também foram relatadas como glicosiladas e caracterizadas quanto à composição dos carboidratos (VALDEZ-CRUZ; BATISTA; POSSANI, 2004; VERANO-BRAGA et al., 2013).

Uma das proteínas com mais registro putativo de N-glicosilação em toxinas de artrópode encontradas no UniProtKB/Swiss-Prot são as fosfolipases D (DE MELO-BRAGA et al., 2022). Como mencionado anteriormente, essa é uma das proteínas mais abundantes encontradas no transcriptoma da glândula de veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008; GREMSKI et al., 2010; KALAPOTHAKIS et al., 2007; MACHADO et al., 2005; MEDINA-SANTOS et al., 2022). Até o momento, existe apenas um trabalho na literatura sobre a importância da glicosilação em atividades do veneno de *L. intermedia* (VEIGA et al., 1999). Esse estudo demonstrou por ensaios *in vitro* e *in vivo* que alguns efeitos do envenenamento, como dermonecrose e a atividade gelatinolítica, diminuíram ao remover a glicosilação das proteínas do veneno por meio de glicosidases. Porém, em outros efeitos como a agregação plaquetária e fibrinogenolítica não foi identificada uma diferença. Algumas das limitações deste estudo é que não houve uma caracterização das proteínas glicosiladas do veneno e não foi possível determinar o impacto estrutural após utilização dessas glicosidases, sendo essa diminuição de função observada por possíveis outros fatores como agregação, mudança conformacional, dentre outros.

1.5 Técnicas e métodos de identificação de glicoproteínas

A busca pelo entendimento do glicoproteoma desenvolveu-se a partir do momento que foi observado uma aparente influência dos padrões de glicanos nas células na progressão de neoplasias, infecções, dentre muitas outras doenças (FREEZE et al., 2014; LOWE; MARTH, 2003; STANLEY, 2016)

Os estudos sobre o glicoproteoma têm grande relação com as demais técnicas ômicas como a proteômica, transcriptômica e genômica. Porém, a enorme plasticidade estrutural dos glicanos, visto que, há vários fatores que influenciam na sua expressão, como por exemplo nutrientes, transcriptoma, proteoma, pH e maquinaria secretora, torna seu entendimento ainda mais difícil (revisado por SCHJOLDAGER et al., 2020) Portanto, a combinação dessas técnicas tem se mostrado uma poderosa estratégia para estudos em larga escala do glicoproteoma, inclusive para explorar a complexidade de venenos (AILI et al., 2020).

A glicoproteômica tem obtido muitos avanços diante da ascensão de instrumentos e técnicas capazes de analisar o repertório dos glicoconjugados em sítios de ligação específicos de proteínas, além de determinar quais tipos de glicanos estão sendo expressos ou secretados num momento específico.

A análise do perfil glicoproteômico de uma amostra complexa pode se dar de várias formas. Uma das técnicas para avaliação do *glycoprofiling* é o gel bidimensional (Gel 2D) com coloração específica para detecção de glicoproteínas. O Gel 2D consiste na utilização de tiras de géis que possuem pH immobilizados, variando em tamanho (7 a 18 cm), pH (3-10; 4-10; 7-10, dentre outros) e linearidade (linear ou não linear). No Gel 2D, as proteínas são separadas pela sua carga, especificamente pelo seu ponto isoelétrico (pI) (isoeletrofocalização), na primeira dimensão, e pela massa molecular na segunda dimensão através do SDS-PAGE. Nesse sentido, o gel 2D fornece uma separação de amostras complexas, sendo possível visualizar diferentes proteoformas, se houver. Um dos métodos mais utilizados para a detecção de glicoproteínas em géis envolve a reação de grupos de carboidratos por um mecanismo de ácido periódico/base de Schiff (PAS, sigla em inglês). Por esse método, os carboidratos são oxidados pelo ácido periódico seguido de conjugação com um substrato cromogênico ou fluorescente, diretamente, ou indiretamente por

substratos enzimáticos ou anticorpos (HART *et al.*, 2003). Desse modo, o gel 2D é capaz de fornecer uma visão geral simples do perfil glicoproteômico daquela amostra.

Para além da presença de glicoproteínas em uma amostra, é muito importante a compreensão, ao menos parcial, das estruturas de glicanos presentes nas proteínas, dada sua influência nas características físico-químicas das proteínas e possíveis influências na função desempenhada por estas. Diversas metodologias analíticas como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa por ionização por *electrospray* (ESI-MS) ou por ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) e eletroforese capilar (CE) foram desenvolvidas e possuem amplo uso (RAMAN *et al.*, 2005). Essas técnicas são frequentemente utilizadas em conjunto e são complementares. Contudo, a espectrometria de massa (MS) é a mais adequada e amplamente utilizada, visto que as glicoproteínas geralmente são uma mistura macro e micro-heterogênea e estão em alguns casos presentes em baixa abundância (SHAJAHAN *et al.*, 2017).

A utilização da espectrometria de massa foi um dos determinantes para revelar a enorme complexidade das proteínas dos venenos, incluindo a identificação e caracterização de PTMs, como a glicosilação. Duas principais abordagens já foram utilizadas para caracterização de venenos: *top-down* e *bottom-up*. A estratégia *top-down*, direcionada para análise de proteínas intactas, permite uma caracterização mais abrangente por conseguir identificar e caracterizar a nível de proteoformas, e seu uso tem ganhado espaço no estudo de venenos (MELANI; NOGUEIRA; DOMONT, 2017). Em 2013, Verano-Braga e colaboradores cunharam o termo “*top-down venomics*” e conseguiram, utilizando LC-MS/MS e sequenciamento *de novo*, identificar peptídeos menores que 10 kDa do veneno de *Tityus serrulatus*, desvendando o papel da proteólise na diversidade molecular de toxinas de escorpiões. Além disso, identificaram a presença de fosforilação em toxinas conhecidas de *T. serrulatus*, a Hipotensina 1 e Hipotensina 2. Nesse estudo também foram encontradas 98 N-glicopeptídeos sendo que 68% supostamente continham ácido siálico, além de identificarem um sítio putativo de N-glicosilação em um Tityustoxina15, uma toxina que bloqueia a corrente de potássio nos canais Kv 1.2 e Kv 1.3 (VERANO-BRAGA *et al.*, 2013). Outros grupos também obtiveram ótimos

resultados para sequenciar e analisar toxinas de diversos outros animais peçonhentos como abelhas e serpentes (BARACCHI et al., 2013; PETRAS et al., 2015). Apesar dos avanços dessa técnica na toxinologia, sua aplicação na maioria dos laboratórios ainda é um desafio, um dos motivos é a dificuldade na separação e fragmentação de proteínas por espectrometria de massa. Portanto a abordagem *bottom-up* ainda é uma das mais utilizadas se tratando de análises menos “complexas”, como por exemplo para identificar a proteína, além de suas PTMs, como a glicosilação. Na estratégia *bottom-up* são utilizadas enzimas específicas para digestão da proteína em peptídeos, sendo a tripsina uma das mais utilizadas.

Após a etapa da digestão, é feito o processo de enriquecimento de glicopeptídeos, pois apesar da glicosilação ser uma modificação comum encontrada na natureza (DOS SANTOS-PINTO et al., 2014), esta etapa visa a melhora da sensibilidade para um estudo com maior cobertura. A captura de glicopeptídeos/proteínas por cromatografia de afinidade por lectinas, cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) e também cromatografia por Dióxido de Titânio (TiO₂) são as principais estratégias utilizadas (SHAJAHAN et al., 2017) podendo ser utilizadas separadamente, mas ao serem combinadas aumenta ainda mais a cobertura da vasta floresta de glicanos presentes. Um exemplo de combinação dessas e outras técnicas para o estudo do proteoma em veneno de artrópodes foi o trabalho desenvolvido por dos Santos e colaboradores em 2010 que detectou 14 proteínas glicosiladas utilizando o gel bidimensional e corante específico para glicosilação citado anteriormente.

E por fim, a análise computacional integrada a essas técnicas permite a anotação e identificação de glicopeptídeos. O desenvolvimento de diversos *softwares* comerciais e acadêmicos auxiliam na desafiadora tarefa de atribuir corretamente a composição de um glicano ou mesmo a posição em que se encontra. Dentre eles estão o Protein Prospector, glyXtool MS, GlycoPAT, Byonic, IQ-GPA, entre outros. Um estudo comunitário de 2021 conduzido pela iniciativa “*HUPO Human Glycoproteomics Initiative*” reuniu desenvolvedores e usuários de software de glicoproteômica a fim de avaliar estratégias para melhor solucionar os grandes desafios nas análises de glicopeptídeos (KAWAHARA et al., 2021). Neste trabalho, foi disponibilizado um mesmo conjunto de dados de soro humano analisado por LC-

MS/MS para diferentes grupos e a partir dos resultados de cada grupo foi avaliado o desempenho das principais ferramentas bioinformáticas que existem atualmente no campo da glicoproteômica. Ainda, foi avaliado a precisão de identificação do glicopeptídeo (especificidade) e a cobertura do glicoproteoma (sensibilidade), tanto para N- quanto O-glicosilações. De um modo geral, os softwares Protein Prospector e Byonic, os pioneiros na área, foram os que apresentaram melhor desempenho, sendo que o primeiro tem a grande vantagem de ser uma ferramenta gratuita e possuir preferência em estudos que abordam anotações de sítios de O-glicosilação. No entanto, esta ferramenta não estima o FDR dos componentes glicanos dos glicopeptídeos e não possui uma interface amigável. Por outro lado, o software Byonic ganhou bastante popularidade por possuir uma plataforma mais amigável e permitir a identificação relativamente direta de peptídeos com modificações conhecidas e desconhecidas, além de apresentar um controle apurado e filtragem pós processamento. Apesar da sua limitação quanto a busca por O-glicopeptídeos e ser um software comercial, o Byonic exibiu alto desempenho em comparação com os demais programas analisados (KAWAHARA et al., 2021).

O estudo de PTMs perpassa por muitos desafios, sobretudo na toxilogia. E apesar do enorme esforço, e dos grandes avanços das técnicas, a análise em larga escala da complexa variedade de proteínas glicosiladas e seus glicanos presente nos venenos ainda está muito longe da realidade, principalmente em relação aos venenos de artrópodes. Portanto, mais estudos se fazem necessários para auxiliar na compreensão dessa importante PTM e abrir caminhos para elucidar o possível impacto destas modificações no envenenamento, ou mesmo na aplicação biotecnológica dos diversos componentes do veneno.

1.6 Importância do desenvolvimento do projeto

Diante dos numerosos estudos que buscaram elucidar os aspectos estruturais e biológicos do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, fica evidente a importância e a natureza complexa de suas toxinas, capazes de atuar em diversos alvos específicos e inespecíficos. Entretanto, há aspectos moleculares do veneno ainda muito pouco explorados, como a composição glicoproteica dessas substâncias. Como citado anteriormente, a glicosilação é a PTM com dados putativos mais

frequentemente descritos no Uniprot/SwissProt em outros organismos (Khoury, 2011), porém pouco descrita em venenos de artrópodes (de Melo-Braga, 2022) o que acreditamos ser uma sub-representação, dada a importância e a frequência dessa modificação em proteínas animais. De um modo geral, as glicosilações atuam na conformação, solubilidade e estabilidade de proteínas e, exercem um papel na comunicação e reconhecimento molecular, sinalização e interação celular, além de atividade e especificidade enzimática (CHANG et al., 2017; HENNRICH; GAVIN, 2015; MA et al., 2019).

Em venenos a glicosilação contribui para diversificação do já complexo proteoma, dada sua capacidade de gerar um aumento do número de proteoformas (YAMASHIRO et al., 2014). Além disso, já foi demonstrado que em algumas toxinas de serpentes, como o caso da rhodotoxina, a especificidade proteolítica é perdida ao ser deglicosilada (revisado por SOARES; OLIVEIRA, 2009; TAN; PONNUDURAI; CHUNG, 1997). Uma metaloprotease de *Crotalus viridis viridis* (Naja kaouthia) teve perda de sua ação hemorrágica após remoção de N-glicosilação (OSIPOV et al., 2004; revisado por SOARES; OLIVEIRA, 2009). Mais recentemente, Brás-Costa e colaboradores (2022) demonstraram a importância do ácido siálico no veneno de várias espécies do gênero *Bothrops*, pois ao ser retirado com ação de neuramidases, as atividades gelatinolíticas, proteolítica sobre o fibrinogênio e de coagulação em plasma humano tiveram suas ações diminuídas. Em aranhas, há apenas um trabalho que observou a diminuição de atividades gelatinolítica e dermonecrótica do veneno *L. intermedia*, ao remover a N-glicosilação (VEIGA et al., 1999). Esses resultados reforçam a hipótese de que as glicosilações em proteínas de veneno desempenham papéis importantes na sua toxicidade.

Apesar disto, ainda é incipiente as informações e dados, principalmente experimentais, sobre as toxinas glicosiladas desses animais, sobretudo de aranhas do gênero *Loxosceles*. Os acidentes causados por aranhas desse gênero são um problema de saúde pública no Brasil. Portanto, a expansão do conhecimento sobre as biomoléculas do veneno, incluindo as glicoproteínas, pode auxiliar na compreensão do seu papel no desfecho do envenenamento. Além disso, pode contribuir para o desenvolvimento de um diagnóstico e melhores formas de tratamento para os sintomas do loxoscelismo.

2.OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é validar e caracterizar as glicosilações encontradas nas toxinas do veneno das espécies de maior importância médica de aranhas do gênero *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*).

2.1 Objetivos específicos

- i) Avaliar o perfil das glicosilações das proteínas dos venenos, utilizando a abordagem de eletroforese bidimensional (2DE);
- ii) Identificar os tipos de carboidratos presentes nos venenos das três espécies por ELLA utilizando lectinas específicas;
- iii) Identificar os glicopeptídeos encontrados no veneno das três espécies e caracterizar as estruturas de glicanos presentes nos sítios de N- e O-glicosilação.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos venenos

Para este estudo, os venenos de três espécies de aranhas (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) foram gentilmente fornecidos pelo Dr. João Carlos Minozzo, do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) localizado no estado do Paraná, Brasil. Os venenos foram colhidos por eletrochoque de 15V administrado no cefalotórax dos animais e enviados em frascos congelados. Ao recebimento, o veneno foi aliquotado em tubo proteína *Lobind*, e mantidos a -80°C. Código dos lotes de venenos utilizados: *L. gaucho*: SVLGCPPPI 120/18; *L. laeta*: SVLLCPPI 1221/18; *L. intermedia*: SVLICPPPI 128/21.

3.2 Quantificação das proteínas dos venenos

As amostras foram quantificadas em duplicatas no instrumento *Qubit Fluorometric Quantification* (Thermo), utilizando o kit *Qubit Protein Assay* segundo as instruções do fabricante. Em resumo, utilizando tubos específicos, as amostras de cada veneno foram incubadas em uma mistura do tampão de proteína com o fluoróforo na proporção 1:199 µL, enquanto para os padrões, a proporção foi de 10:190 µL. Após

15 minutos de incubação no escuro, foi feita a calibração com os padrões e, logo após, a quantificação de cada um dos venenos.

3.3 Eletroforese bidimensional (2DE)

Este procedimento foi realizado de acordo com Kalapothakis e colaboradores (KALAPOTHAKIS et al., 2007) e Machado e colaboradores (MACHADO et al., 2005) com algumas adaptações.

3.3.1 Preparação da amostra

Inicialmente foi feita uma padronização de quantidade de amostra concomitantemente ao método de isoeletrofocalização (IEF). Foram testadas as quantidades de 50, 60 e 75 µg de veneno, sendo as amostras precipitadas por no mínimo 4h a *overnight*, à -20°C, com acetona P.A gelada na proporção 1:6.

Após a precipitação, foi feita uma centrifugação a 15.000g, 4°C por 10 minutos. Todo o sobrenadante foi retirado com uma pipeta, sem perturbar o pellet e o tubo foi deixado por volta de 20 minutos aberto, evaporando o que restou da acetona.

3.3.2 Reidratação passiva da Strip

O pellet foi ressuspendido em tampão de reidratação (7M Ureia; 2M Tiourea; 2% CHAPS; 0,002% de solução de Azul de Bromofenol a 1%) adicionando mais 18mM de DTT, 0,5% de anfólitos *IPG buffer* 3-10 NL (BioRad) e 1% de inibidor de protease em um volume total de 125µL de tampão por *strip*. Em seguida, foi realizada a reidratação passiva da *strip* (7 cm, pH 3-10NL, BioRad). Nessa etapa, a solução da amostra é aplicada em uma canaleta da bandeja de reidratação de acordo com o tamanho da *strip*. A *strip* foi então colocada na canaleta com o gel virado para baixo começando pelo lado positivo, evitando deixar bolhas para garantir que todo o gel estivesse em contato com a solução. A reidratação foi realizada *overnight* à temperatura ambiente.

3.3.3 Primeira dimensão - Isoeletrofocalização (IEF)

No outro dia, a strip foi retirada da bandeja e colocada no instrumento IPGPhor (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e com o gel virado para cima para realizar a focalização isoeletrica. Essa primeira dimensão separa as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI). A IEF também passou por etapas de padronização de modo que não se perdesse a amostra e obtivesse um gel com poucos ruídos e com spots bem delimitados.

3.3.4 Equilíbrio da Strip - Redução e alquilação

Após a IEF, a strip foi equilibrada por 15 min sob agitação em 5 mL de tampão de equilíbrio (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de ureia, 30% de glicerol, 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL (64,82 mM) de DTT para redução das pontes dissulfeto. Em seguida, a strip foi incubada sob agitação por mais 15 minutos em 5 mL de tampão de equilíbrio, contendo 25 mg/mL (135,16 mM) de iodoacetamida para a alquilação dos grupos tióis.

3.3.5 Segunda dimensão - SDS-PAGE

Finalizada a primeira dimensão, as proteínas presentes na Strip foram separadas de acordo com sua massa molecular pelo clássico método SDS-PAGE em condições não redutoras. Foi preparado um gel de 12,5% de poliacrilamida. A strip, após ser equilibrada foi lavada algumas vezes por até 5 minutos em tampão de corrida (25 mM tris; 190 mM glicina e 0,1% SDS) e colocada, com auxílio de uma pinça fina, em contato com o gel polimerizado, de modo que o lado positivo fique à esquerda da placa e o gel virado para frente. Do lado direito da placa foi colocado em um pedaço de papel filtro (1x1 cm) 3µL do padrão de massa molecular *Precision Plus Protein*TM (BioRad) e em outro papel 4µL do padrão de glicoproteínas *CandyCane*TM diluído em 4µL de tampão de amostra 2x. Após colocar a *strip* e os papéis filtros, foi adicionado 1mL da solução de agarose quente (25 mL de tampão de corrida 1x; 0,5% de agarose; 0,5% de azul de bromofenol a 1%), sem deixar bolhas. A corrida da segunda dimensão foi realizada a 100V até a completa separação por massa molecular das proteínas.

3.3.6 Coloração

Para detecção de proteínas glicosiladas, foi utilizado o kit Pro-Q® *Emerald 300 Glycoprotein Gel and Blot Stain* (Thermo Scientific), segundo instruções do fabricante. O kit utiliza uma hidrazina fluorescente para reagir com os grupos de carboidratos oxidados por ácido periódico nas glicoproteínas.

Em resumo, o gel passou por duas etapas de fixação com uma solução composta de 50% de metanol mais 5% de ácido acético, a primeira por 45 minutos e a segunda *overnight*. Posteriormente, foram feitas duas lavagens de 15 minutos cada com 3% de ácido acético. Após a lavagem, foi feita uma das partes mais importantes do processo, a oxidação dos glicanos presente nas glicoproteínas do gel. Essa reação foi realizada utilizando 25 ml de ácido periódico a 1% em ácido acético a 3% por 30 minutos sob agitação, oxidando carboidratos em aldeídos, os quais vão reagir com a hidrazina fluorescente contida no reagente de coloração. Mais duas lavagens foram feitas antes da etapa de coloração. A coloração foi feita com a marcação fluorescente Pro-Q™ *Emerald 300* sob proteção da luz por duas horas em agitação constante. Mais duas lavagens foram feitas e por fim o gel foi revelado utilizando um fotodocumentador Gel Doc Ez (BioRad) com estimulação de luz ultravioleta 300 nm emitindo um comprimento de onda de luz visível.

Após a detecção da glicosilação, os géis passaram por dois diferentes protocolos de identificação de proteínas totais: SyproRuby e Coomassie coloidal. A coloração pelo *SYPRO® Ruby protein gel stain* (Sigma) foi realizada para avaliação do perfil proteômico total de acordo com as instruções do fabricante com algumas alterações. Em resumo, o gel foi fixado por 30 minutos em uma solução de 10% de metanol mais 7% de ácido acético. Aproximadamente 25 ml do corante *Sypro Ruby* foi colocado sobre o gel e incubado sob proteção da luz em constante agitação por 3 horas. Por fim, foi realizada uma lavagem de 30 minutos com a mesma solução de fixação (10% metanol, 7% ácido acético). O *Sypro Ruby* tem excitação máxima em aproximadamente 280 nm e 450 nm. Para detecção, também foi utilizado o transiluminador com filtro UV 300nm e fotodocumentador Gel Doc Ez (BioRad).

Já a coloração por Coomassie coloidal foi feita para identificação dos *spots* a olho nu e posterior excisão de alguns destes. Esta coloração seguiu três etapas de fixação

todas com 3 vezes de 30 min: i) 2% de ácido ortofosfórico / 30% de etanol, ii) 2% de ácido ortofosfórico, e iii) solução com 2% ácido ortofosfórico, 18% etanol e 12% sulfato de amônio. Posteriormente, 4 mL de Coomassie G-250 a 2% foi adicionado e o gel foi mantido sob agitação por 5 dias, sendo que no 3º dia foi observado se já tinha começado a corar e foi adicionado mais 2 mL da solução de Coomassie. Após esse procedimento, alguns *spots* foram selecionados para excisão e posterior análise no espectrômetro de massa.

3.3.7 Análise quantitativa dos géis

Com o objetivo de verificar a quantidade de spots detectados nas diferentes colorações utilizamos o programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*. Foi determinado inicialmente um índice de saliência mínimo para ser considerado como um spot marcado, definido pelos controles positivos do gel. A partir desse índice, que foi de 5.0000, o programa gerou automaticamente todos os *spots* marcados, aqueles considerados resíduos e interferências foram excluídos manualmente. Algumas edições da delimitação dos *Spots* também foram feitas e, após esse procedimento, foi gerado o relatório pontual dos géis. Feito essa detecção e edição, os géis dos venenos de cada espécie de *Loxosceles* marcados pela coloração específica de glicosilação foram comparados com os géis das respectivas espécies corados por proteínas totais, gerando um *Match* e sendo possível observar quais *spots* estavam marcados em ambos os géis.

3.4 Ensaio de lectina ligado a enzima para detecção de carboidrato

Para identificar alguns possíveis tipos de glicanos presentes no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* foi realizado o ensaio de lectina ligada à enzima (ELLA), uma metodologia baseada em lectina desenvolvida para estudar glicoproteínas e outros glicoconjugados e interações glicano-lectina. Essa detecção acontece pela interação de glicanos presentes no antígeno com as lectinas, que possuem afinidades específicas para certos epítomos dos glicanos.

Seguindo o mesmo formato básico de um ensaio imunoenzimático (ELISA) padrão, para o ELLA utilizamos uma placa de 96 poços (Corning® Costar 3590) que foi sensibilizada *overnight* à temperatura ambiente com as amostras de venenos de *L.*

intermedia, *L. laeta* e *L. gaucho*, além dos controles positivo (fetuína) e negativo (albumina do soro bovino - BSA). Foram utilizados 2 µg/mL de amostra em tampão PBS 1x (fosfato de sódio monobásico 1,8 mM; fosfato de sódio dibásico 10 mM, cloreto de sódio 137 mM, pH 7,4) com o volume final de 100 µL por poço. No outro dia, os poços foram lavados 4 vezes com solução PBS-Tween 20 0,01% (solução de lavagem), e bloqueados por 30 minutos em temperatura ambiente com a solução de bloqueio *Carbo-Free Blocking Solution* (Vector Laboratories) diluído 10x em PBS 1x (200 µL por poço). Novamente, mais 4 lavagens foram feitas e posterior adição de 100 µL por poço das lectinas do *biotinylated Lectin Kit I* (Vector Laboratories): ConA, SBA, WGA, DBA, UEA I, RCA, PNA, na diluição 1:5000 e das lectinas SNA, MAL II (Vector Laboratories) na diluição de 1:10000 em PBS 1x. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada 4 vezes e então incubada com estreptavidina marcada com *horseradish peroxidase* (HRP) (Sigma) diluída a 1:10.000 em PBS-Tween 0,01% por 1 hora à temperatura ambiente (100 µL por poço). As últimas 4 lavagens foram feitas e seguiu-se para revelação com o *TMB Substrate Kit* (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante, misturando em partes iguais a solução de TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) com a solução de peróxido de hidrogênio (0,02%). A placa foi incubada sob proteção da luz por 15 minutos, parando a reação após esse tempo com 100 µL por poço de ácido sulfúrico 2M. Em seguida, a absorbância foi medida no leitor de placa *Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer* (Thermo Scientific) a 450 nm. Todo experimento foi feito em triplicata.

3.5 Análise de dados de glicoproteômica de veneno de *Loxosceles*.

No presente trabalho, foi realizada a análise dos dados de glicoproteômica, em específico dos glicopeptídeos intactos, obtidos anteriormente durante o trabalho de mestrado do Bruno César Souza Silva, 2020 (SILVA, 2020). Em resumo, a metodologia utilizada por Bruno Silva foi baseada no trabalho de Verano-Braga e colaboradores em 2013, com algumas alterações (VERANO-BRAGA et al., 2013). O veneno das três espécies de *Loxosceles* foi analisado pela abordagem *bottom-up*, avaliando as proteínas retidas no filtro com *cut-off* de 10 kDa. Posteriormente, os peptídeos glicosilados foram enriquecidos por cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC, sigla em inglês) de acordo com o trabalho de ALVES et al., 2017.

Os glicopeptídeos foram analisados por cromatografia líquida no HPLC nanofluxo EASYnLC (Thermo) acoplado ao espectrômetro de massa Q-Exactive-HF (Thermo) (LC-MS/MS). Um resumo dessa estratégia experimental pode ser visto na Figura 6.

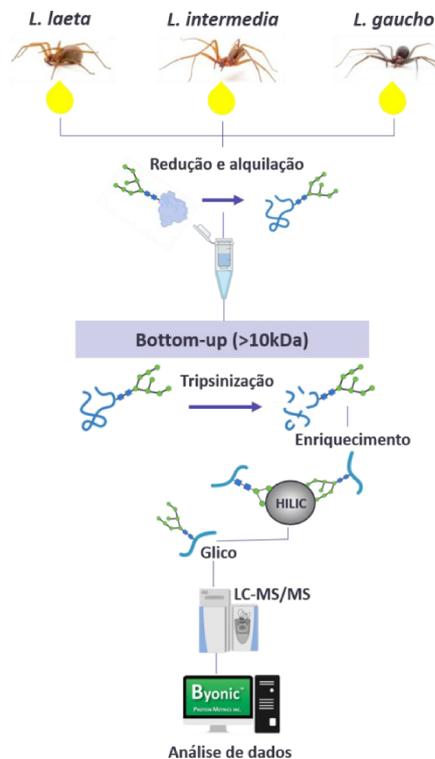


Figura 6 - Esquema da metodologia de glicoproteômica dos venenos de aranhas *Loxosceles*. Desenho experimental da glicoproteômica executado por Bruno Silva (2020) em seu trabalho de mestrado com foco na análise de glicopeptídeos intactos realizado neste presente projeto.

Os espectros das duas replicatas de peptídeos glicosilados intactos, ou seja, que não foram deglicosilados com PNGaseF, foram processados no software Byonic v4.4.2 (Protein Metrics) contra as proteínas do banco customizado de sequências de aranhas do gênero *Loxosceles* (24.082 sequências) criado também durante o mestrado do Bruno. Este banco reúne sequências de proteínas de *Loxosceles* presentes no NCBI e sequências traduzidas do genoma de *L. reclusa* (SILVA, 2020).

As buscas no *Byonic* foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: i) tripsina foi selecionada como enzima com o máximo de duas ausências de sítios de clivagens (missed cleavages), ii) carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, e como modificações variável foram incluídas a oxidação de metionina e ácido

piroglutâmico no N-terminal das proteínas, iii) glicosilação no resíduo de asparagina com um banco de dados predefinido contendo 38 tipos de N-glicanos de insetos ou O-glicosilações em resíduos de serina e treonina considerando um banco de dados predefinido com 9 tipos de O-glicanos mais comuns, iv) tolerância de massa do precursor e dos fragmentos de 10 ppm e 0,05 Da, respectivamente e v) <1% de taxa de falsa descoberta (FDR, sigla em inglês).

Após processar os dados, apenas os glicopeptídeos identificados com o PEP-2D menor do que 0,001 e com *score* maior do que 100 foram considerados para análises (KAWAHARA et al., 2021). Glicopeptídeos identificados no banco de dados reverso, contaminantes e as redundâncias foram excluídos.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil glicoproteômico do veneno de três espécies de *Loxosceles*

Para compreender o perfil proteômico das amostras analisadas e confirmar a presença de glicosilações no veneno de *Loxosceles* já observadas anteriormente pelo grupo, a primeira abordagem utilizada foi o gel bidimensional (2DE).

Inicialmente foi realizada uma padronização da quantidade de veneno a ser utilizado no gel. Foram testadas as quantidades de proteínas do veneno de 50, 60 e 75 µg (Figura 7), sendo que a quantidade de 60 µg obteve melhor resultado de modo que os *spots* ficassem evidentes e bem delimitados.

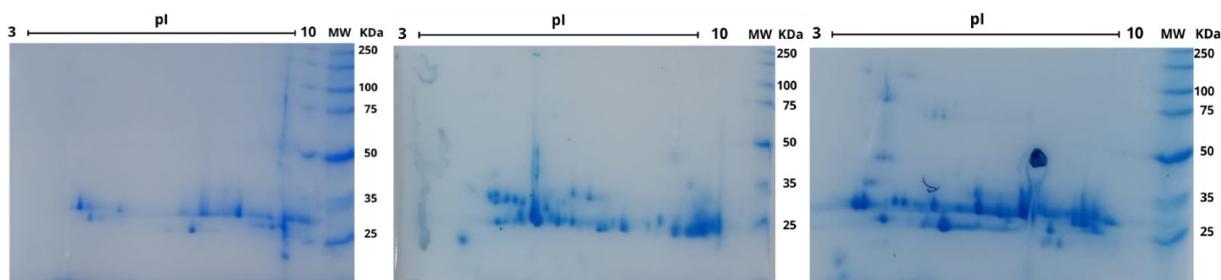


Figura 7- Padronização da quantidade de veneno no gel 2D. Géis bidimensionais com diferentes quantidades de amostras testadas utilizando *strips* de gel de 7 cm com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 3 a 10 NL. Logo após foram submetidas a um SDS-PAGE com gel de poliácridamida 12,5% e posteriormente os géis foram corados com coomassie coloidal. Da esquerda para direita a quantidade testada foi de 50 µg, 60 µg e 75 µg.

Para a isoeletrofocalização (IEF) foi utilizada a seguinte configuração mostrada na Tabela 1, levando em consideração o tipo de amostra (veneno), o tamanho da strip (7cm) e o seu tipo (não linear).

Tabela 1 – Configuração da isoeletrofocalização (IEF) - Tabela dos passos e voltagens utilizados na corrida da primeira dimensão do Gel 2DE.

Programa IEF – Gel 7cm 3-10NL		
step	500V	3 horas
step	1.000V	30 min
grad	5.000V	2h e 30min
step	5000V	1h
step	500V	2h

O perfil proteômico total do veneno das três espécies estudadas foi obtido utilizando a coloração Sypro Ruby (Thermo Scientific), onde observa-se proteínas dispersas em uma ampla faixa de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM), embora apresentem *spots* mais concentrados na faixa correspondente a 25 a 37 kDa (Figura 8A). Após a coloração com o kit comercial *Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel and Blot Stain* (Thermo Scientific) foi possível observar, no veneno das três espécies, diversos *spots* marcados como glicosilados em diferentes pI e também na faixa de 25 a 37 kDa (Figura 8B).

No gel com o veneno de *L. gaucho*, após análise no programa *Image Master 2D platinum*, foram identificados 10 *spots* marcados como glicosilados, correspondente a 43,47% dos 23 *spots* totais marcados ao corar por Sypro. O gel com o veneno de *L. intermedia* apresentou 9 *spots* glicosilados contra 36 *spots* do proteoma total, o que corresponde a 25% ou 33,33 % ao considerar os 27 *spots* marcados na faixa de 25 a 37 kDa. E por último, no gel de *L. laeta* foram identificados menos *spots* glicosilados, 7, em razão de 43 totais no proteoma e 40 *spots* marcados na faixa de 25 a 37 kDa, o que corresponde a 16,27 e 17,5% respectivamente (Figura 8C).

A faixa de 25 a 37 kDa corresponde a massa molecular comumente associada a proteoformas de fosfolipase D (30 a 35 kDa), metaloproteases (20 a 32 kDa) e hialuronidases (33 kDa), importantes toxinas do veneno de *Loxosceles* (FEITOSA et al., 1998; WRIGHT et al., 1973). Os *spots* que têm a mesma MM e pI diferentes

chamamos de proteoformas e aqueles marcados como glicosilados, denominamos de glicoproteoformas. Portanto, por essa abordagem confirmamos a presença de glicoproteínas e o perfil de distribuição delas, observando que de 7 a 10 proteoformas, o que corresponde de 17 a 43%, na faixa molecular das proteínas citadas anteriormente, são marcadas como glicosiladas nas três espécies estudadas.

Os dados obtidos nessa análise revelam um perfil diverso de glicosilações, marcado em uma ampla faixa de pI e diferentes MM. Porém, como cada *spot* pode conter mais de uma proteína e a presença de glicosilações afetam essas características (ANDRADE-SILVA, *et al.*, 2018), o número total de proteínas únicas no 2DE pode ser maior do que o apresentado. Além disso, há uma limitação principalmente quanto ao tamanho da strip utilizada (7 cm). Trevisan-Silva e colaboradores em 2013 utilizando uma *strip* de 13 cm identificaram 171 spots totais no veneno de *L. intermedia*, 190 no de *L. gaucho* e 112 em *L. laeta* (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013). Outros trabalhos que avaliaram o perfil proteômico de aranhas *Loxosceles* por eletroforese bidimensional utilizando strips de 18 cm, apresentaram uma melhor separação dos *spots*, e marcações não vistas aqui (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2005). No entanto, um perfil semelhante aos anteriormente reportados de distribuição de *spots* marcados na faixa molecular e pI foram observados neste trabalho. Diante dessa limitação, há possibilidade, portanto, de ter outras proteínas não detectadas que poderiam estar glicosiladas, mas não foram vistas utilizando esta técnica.

Embora essa caracterização proteômica já tenha sido realizada, até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que fez a caracterização glicoproteômica por 2DE de toxinas aranhas do gênero *Loxosceles*. Em 2010, dos Santos e colaboradores utilizaram o mesmo corante para detecção de glicoproteínas em veneno da vespa *Polybia paulista* e encontraram 14 spots marcados (dos Santos *et al.*, 2010), um número próximo ao observado neste presente trabalho.

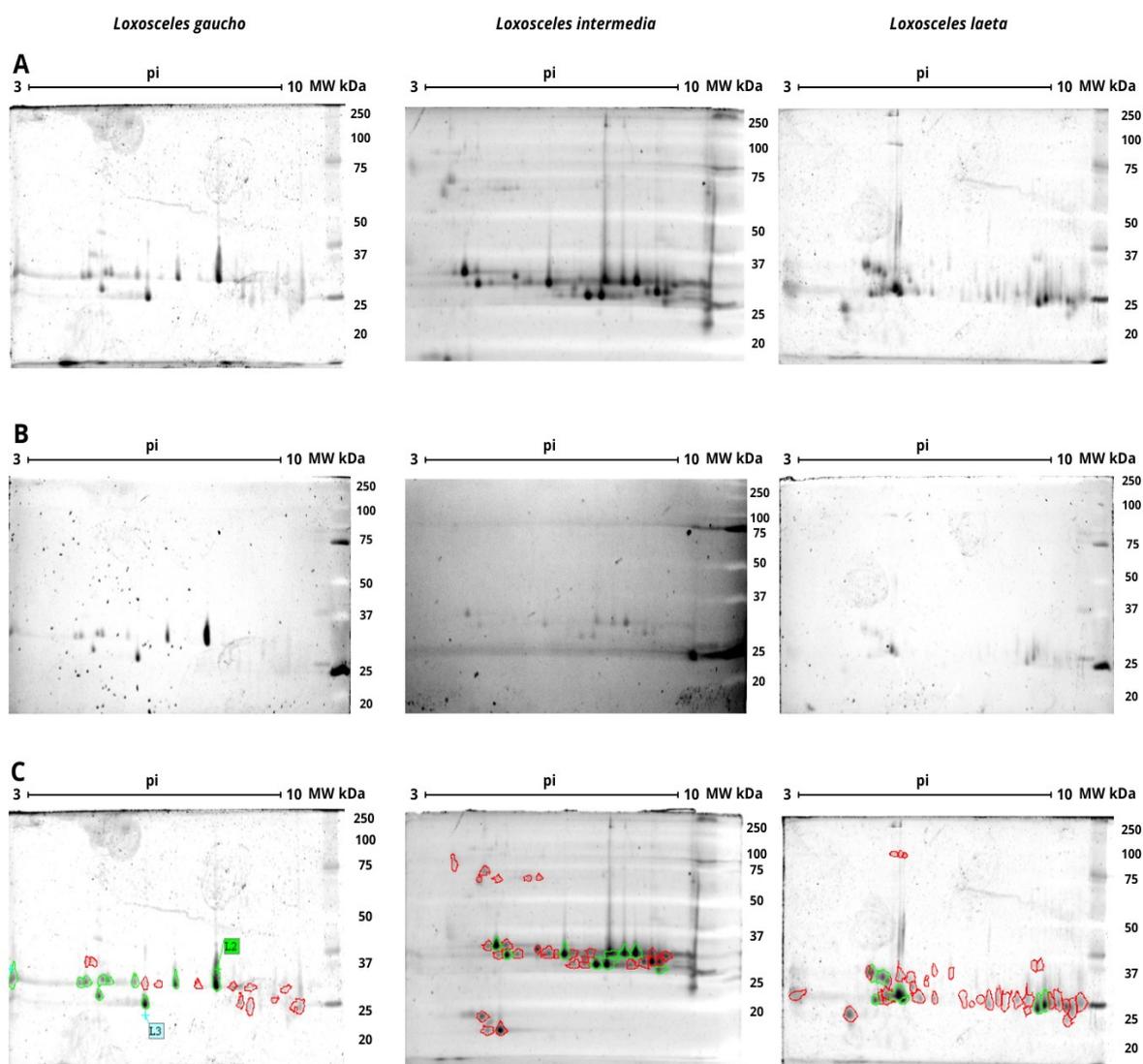


Figura 8 - Perfil (glico)proteômico do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* por gel bidimensional (2DE). A quantidade de 60 µg de veneno bruto de cada uma das espécies *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* foram separadas por focalização isoeétrica (IEF) em *strips* de gel de 7 cm com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 3 a 10, não linear, determinando o pI (ponto isoeétrico) das proteínas. Logo após, foram submetidas a um SDS-PAGE de 12,5% separando as proteínas por sua massa molecular (MW) dada em kDa. A coloração por SYPRO Ruby (A) mostra o perfil proteômico total do veneno das três espécies. O mesmo gel corado por Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein (B) apresenta o perfil das proteoformas marcadas como glicosiladas. A detecção dos *spots* nos géis foi realizada pelo software Image Master 2D Platinum (C). No total, foram identificados no gel de *L. gaucho* 23 *spots* marcados (círculos verdes e vermelhos) sendo que 10 desses *spots* foram detectados como glicosilados (círculos verdes). No gel de *L. intermedia* foi observado um total de 36 *spots* (círculos vermelhos e verdes), sendo 9 glicosilados (círculos verdes) e por

fim no de *L. laeta* 43 spots no perfil proteico total para 7 marcados como glicosilados (círculos verdes).

4.2 Detecção de diferentes tipos de carboidratos no veneno de *Loxosceles*

Para avaliarmos a possível composição dessas glicosilações, realizamos um ELLA com nove tipos de lectinas que possuem especificidades de ligação por epítopos de diferentes glicanos como manose e glicose α -manosiladas (ConA), N-acetilgalactosamina (SBA, RCA, DBA), galactose (RCA, PNA), N-acetilglicosamina (WGA), α -fucose (UEA), ácido siálico 2-3 (MALL II), e ácido siálico 2-6 (SNA).

Nos resultados da reatividade dessas lectinas (Figura 9), observa-se que há possíveis glicoproteínas no veneno das três espécies que contém um alto teor de manose e N-acetilglicosamina, indicando, portanto, a presença de N-glicosilações. Diferentes reatividades entre as espécies para N-acetilgalactosamina e galactose também foi observada, sugerindo, portanto, a presença de O-glicosilações. Outro achado importante foi a reatividade dos venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* pela lectina SNA, a qual tem especificidade ao ácido siálico (2-6), e não pela MAL II, que possui especificidade para ácidos siálicos (2-3), nos dando um painel mais detalhado dos tipos de interação com os glicanos presentes nas amostras analisadas. Neste experimento não foi observada a presença de α -fucose em nenhum dos venenos.

A aplicação desta abordagem de ligação de lectina auxiliou na descoberta de algumas particularidades nos tipos de glicosilações presentes nos venenos analisados. Entretanto é importante considerar a complexidade das interações entre lectinas e glicanos, por ter uma afinidade baseada em múltiplas interações entre o glicano, a parte da lectina e a não glicana das glicoproteínas. Desse modo, é um desafio prever como as lectinas se comportam em relação à sua seletividade e especificidade, quando expostos a misturas complexas de proteínas, como é o caso dos venenos (Brás-Costa et al., 2022), contudo, é extremamente comum o uso de lectinas em diferentes técnicas para explorar o glicoproteoma de toxinas de várias espécies (ANDRADE-SILVA et al., 2016; BRÁS-COSTA et al., 2022b; NAWARAK; PHUTRAKUL; CHEN, 2004; VEIGA et al., 1999).

Apesar de alguns indícios sobre a composição de glicosilações no veneno de *L. intermedia*, dada a afinidade de ligação pela lectina ConA observada por Veiga e colaboradores em 1999 (VEIGA et al., 1999), é a primeira vez que é realizada uma caracterização mais abrangente por ELLA dos tipos de carboidratos presentes no veneno das três principais espécies de importância médica do gênero *Loxosceles*.

A

Lectinas	Especificidade das lectinas	Reatividade dos venenos pelas lectinas			Controles	
		<i>L. intermedia</i>	<i>L. gaucho</i>	<i>L. laeta</i>	Fetuina (C+)	BSA (C-)
Con A	Manose	2,51	2,05	2,51	2,03	0,12
SBA	N-Acetilgalactosamina	0,75	0,20	0,75	0,00	0,00
WGA	N-Acetilglucosamina	2,37	2,17	2,37	1,87	0,00
DBA	N-Acetilgalactosamina (α -galNAc)	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00
UEA	Fucose (α -fucose)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RCA	N-Acetilgalactosamina, Galactose	1,66	1,48	1,66	2,09	0,00
PNA	Galactose	1,85	2,74	1,85	0,00	0,00
SNA	Acido sialico α NeuNAc(2 \rightarrow 6)	1,36	0,28	1,36	1,92	0,16
MALII	Acido sialico α NeuNAc(2 \rightarrow 3)	0,02	0,00	0,02	2,08	0,00

B

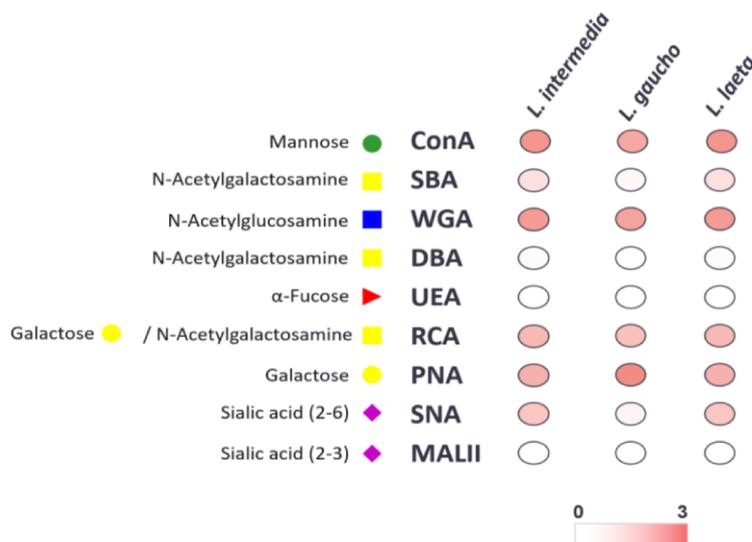


Figura 9 - Ensaio de lectina ligado a enzima para detecção de carboidratos em venenos de *Loxosceles*. As placas foram sensibilizadas com 2 μ g/ml de cada veneno de *Loxosceles* e com os controles positivo (C+) (fetuina) e negativo (C-) (soro fetal bovino – BSA) e posteriormente incubadas com as lectinas biotiniladas (Vector Laboratories) com diferentes especificidades para carboidratos, sendo ConA, SBA, RCA, DBA, RCA, PNA, WGA e UEA incubadas na proporção 1:5000, e SNA e MAL II incubadas na proporção 1:10000. Em seguida, a placa foi incubada com estreptavidina (Sigma Aldrich), na

concentração 1:10000, revelada por TMB - 3,3', 5,5; -tetramethylbenzidine (Thermo) e medida a absorvância no comprimento 450 nm. Reatividade expressa pelo valor da média da triplicata subtraída pelo branco. A) valores absolutos das leituras de absorvância variando de 0 a 3 com uma gradação da escala da cor rosa, em que quanto mais escuro mais próximo de 3. B) representação esquemática dos resultados em que também varia o tom da cor na mesma lógica citada anteriormente e respectivos símbolos de carboidratos específicos das lectinas utilizadas.

4.3 Glicoproteômica

Tendo em vista a viabilidade do estudo de glicosilações em toxinas e a necessidade de compreender melhor esse importante aspecto no veneno de aranhas-marrom, este trabalho focou na análise dos glicopeptídeos intactos para caracterizar o sítio e as estruturas de N- e O-glicosilações nas toxinas das 3 espécies de importância médica do gênero *Loxosceles*.

Pela abordagem *bottom-up* feita pelo grupo anteriormente, foi realizado o enriquecimento dos glicopeptídeos pela coluna de interação hidrofílica (SILVA, 2020). Este modo de cromatografia utiliza da hidrofílicidade densa de glicopeptídeos para separá-los dos peptídeos não modificados (ALVES et al., 2017). No presente trabalho, os dados obtidos pelo LC-MS/MS foram processados pelo software Byonic contra o banco de sequências criado pelo grupo anteriormente (SILVA, 2020).

4.3.1 Identificação de glicopeptídeos encontrados nos venenos.

Após processar os dados das duplicatas no *Byonic* e aplicar os filtros PEP2D < 0.001 e Score > 100, identificamos 100 sequências de peptídeos N- e O-glicosilados nas três espécies (Tabela 2 e 3, respectivamente), sendo no total, 30 de *L. gaucho*, 47 de *L. intermedia*, e 23 de *L. laeta*.

A Tabela 2 apresenta o resumo dos achados na análise de N-glicosilações dos venenos das três espécies estudadas, compilando as sequências de peptídeos glicosilados detectados em cada espécie sem redundância, com o sítio de glicosilação na sequência, e a proteína referente ao peptídeo. Adicionalmente, também apresenta dados que serão discutidos mais adiante na seção 4.3.3.

Um achado de destaque nessa análise que pode ser observada na Tabela 2 é que há várias sequências de peptídeos que são de proteínas da mesma classe, mas que podem pertencer a diferentes glicoproteoformas, ou seja, nem sempre todos os sítios estarem glicosilados na mesma proteoforma. Esse é o caso, por exemplo, da enzima conversora de angiotensina (ID EY188427) com as sequências N-glicosiladas LQELISnMTDMYSTAK e nATSFAWK em *L. gaucho* e ILQPYHNEQAI_nVTQTMIEK, LQELISnMTDMYSTAK e nATSFAWK em *L. laeta* (Tabela 2- seta azul). Esse fenômeno também ocorreu em outras proteínas como as astacin-like metaloproteases, em que foi observado 8 sequências diferentes, correspondendo a 4 ID (EF028089; CONTIG128; CONTIG039; HO002982) de proteínas em *L. intermedia* (Tabela 2- Box azul). Também foi possível observar diferentes sequências de peptídeos O-glicosiladas associadas a proteoformas de fosfolipases D (Tabela 3), e em alguns casos, como o NATLPGNPK, a mesma sequência foi vista N e O-glicosilada (Tabela 2 e 3- seta preta).

A ocorrência desses eventos sugere que mais de um domínio ou região da proteína esteja glicosilado e/ou, confirma que haja, com grandes chances, diferentes proteoformas com N e O-glicosilações dentro do complexo de venenos.

Além disso, foi possível identificar o número de sítios de N- e O-glicosilação dentro da sequência dos peptídeos. Todos os N-glicopeptídeos apresentaram apenas um sítio modificado, exceto o nGSEHNFDKLWEnNTR referente a uma astacin-like metaloprotease no veneno de *L. intermedia*, que possui dois sítios glicosilados (N1 e N13) (Tabela 2- seta rosa). Já nos peptídeos O-glicosilados (Tabela 3), a presença de mais um sítio de glicosilação foi comum na maioria das sequências obtidas.

Importante ressaltar que a identificação dos glicopeptídeos e a correspondência destes com a referentes proteínas perpassa por uma grande limitação quanto a cobertura do banco de sequências utilizado. Esse banco criado pelo grupo anteriormente utilizou informações de banco de dados públicos como ArachnoServer, UniProt e NCBI (GenBank e GenPept) que contém pouca informação sobre sequências de *L. gaucho*. Há apenas 52 sequências depositadas dessa espécie nos bancos de dados, enquanto que *L. intermedia* possui 2012 e *L. laeta*, 1489 sequências (SILVA, 2020). Portanto, apesar dos peptídeos glicosilados

encontrados terem 100% de identidade com a proteína correspondente descrita nas Tabelas 2 e 3, grande parte destes no veneno de *L. gaucho* eram referentes a proteínas encontradas em outras espécies de *Loxosceles*. Para confirmação da identidade completa da sequência, uma alternativa é a identificação dos *spots* marcados como glicosilados no gel 2D por *in gel digestion* e espectrometria de massa, uma das perspectivas deste projeto.

Tabela 2 - Peptídeos N-glicosilados nos venenos das 3 espécies de *Loxosceles*. Relação das sequências detectadas em cada espécie sem redundância, o sítio de glicosilação, a proteína referente ao peptídeo e o nº e ID das glicofomas encontradas (estruturas representadas na figura 14). **Proteínas hipotéticas, sem anotação ou função definida.

Espécie	Proteína	ID da proteína	Sequência do peptídeo	Sítio glicosilado	Nº de glicofomas	ID da glicofoma
<i>L. gaucho</i>	ALKALINE PHOSPHATASE	LREC003275	K.YEAVGVDDSIHGNCSVLTGLR.C	N14	1	1CH
	ALKALINE PHOSPHATASE	LREC003275	K.TKYEAVGVDDSIHGNCSVLTGLR.C	N16	2	5P; 1CH
	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	EY188427.1 LLAE0055C	K.LQELISNMTDMYSTAK.V	N7	7	5P; 7P; *CH; 1CH; 3CH; *CH; 5CH
	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	EY188427.1 LLAE0055C	R.NATSAFAWK.D	N1	7	4CH; 5P; 7P; 8P; 10; 1CH; 5CH
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 3 PRECURSOR	EY188681.1 LLAE0309C	R.FYNNTR.V	N3	1	1CH
	ISOLATE LOXTOX S11B LOXTOX PROTEIN MRNA	KU891961.1	K.VYTWISIDKNSSIR.H	N9	3	5P; 1CH; 5CH
	ISOLATE LOXTOX S3A LOXTOX PROTEIN MRNA	KU891946.1	R.NATLPGNPK.F	N1	22	Todos exceto 6P; 9P; 50; 2CH
	ISOLATE LOXTOX S7A LOXTOX PROTEIN MRNA	KU891951.1	R.AFNLTLOQ.G	N3	2	10; 20
	ISOLATE LOXTOX S8B LOXTOX PROTEIN MRNA	KU891953.1	K.CFHKENVTEYLDHIR.Q	N6	3	1CH; 2CH; 5CH
	ISOLATE LOXTOX S8B LOXTOX PROTEIN MRNA	KU891953.1	K.GANAEFDIEFDANGTAQHHTHHGFPDCDGR.K	N14	2	5P; 1CH
	ISOLATE LOXTOX S9A LOXTOX PROTEIN MRNA; COMPLETE CDS	KU891955.1	R.VNITR.R	N2	2	1CH; 5CH
	ORGANIC CATION TRANSPORTER PROTEIN	LREC002613	R.SAVNSSTEK.C	N4	5	5P; 6P; 8P; 1CH; 2CH
	PHOSPHOLIPASE A2	LREC009947	R.AHDLCDNTLAPGATR.N	N6	4	5P; 7P; 8P; 1CH
	PHOSPHOLIPASE A2	LREC009947	R.NNLTNNSPFTK.L	N2	2	5P; 8P
	SCO-SPONDIN	LREC010517	K.GQIYNDTK.D	N5	5	7P; 10; 20; 6CH; 30
	SIMILAR TO 5'-NUCLEOTIDASE	EY189687.1 LLAE1315S	R.VTFNVSNPPGER.V	N4	1	*CH
	SIMILAR TO 5'-NUCLEOTIDASE	EY188412.1 LLAE0040C	K.VVVCNINATEEPEFER.L	N7	5	5P; 6P; 1CH; 2CH; 5CH
	SIMILAR TO CYCLOPHILIN G	EY189471.1 LLAE1099S	K.DTNGSQFFITTK.K	N3	1	5P
	SIMILAR TO TRYPSIN-LIKE SERINE PROTEASE	EY189603.1 LLAE1231S	R.ENDTRPLCK.C	N2	3	1CH; 5P; 3P
	SIMILAR TO TRYPSIN-LIKE SERINE PROTEASE	EY189603.1 LLAE1231S	R.RENDRPLCK.C	N3	1	5P
	SLIT-LIKE PROTEIN	EY188912	R.ESFQNVSR.S	N5	1	5P
	HYPOTHETICAL PROTEIN AVEN**	LREC010333	R.RSHHHQNHSSENYR.V	N7	1	5P
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5**	CONTIG100	R.CCSPYQCQGDYHCGCYNNCTFGCR.H	N19	3	6CH; 5CH; 7CH
VENOMOUS GLAND LIBRARY LOXOSCELES INTERMEDIA CDNA**	EY189341	K.SPWFHCFPNK.T	N9	6	5P; 6P; 8P; 1CH; 2CH; 5CH	
<i>L. laeta</i>	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	EY188427.1	K.ILOPYHNEQAINVTQTMIEK.K	N12	1	7P
	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	EY188427.1	R.NATSAFAWK.D	N1	5	5P; 7P; 10; 1CH; 5CH
	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	EY188427.1	K.LQELISNMTDMYSTAK.V	N7	6	5P; 7P; 6P; 1CH; 3CH; 5CH
	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME-LIKE	EY188430.1	K.YISGGNTNK.T	N8	3	5P; 7P; 6P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 3 PRECURSOR	EY188681.1 LLAE0309C	R.FYNNTR.V	N3	3	5P; 6P; 8P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN PRECURSOR.	EY188384.1	K.LWENK.T	N4	3	5P; 6P; 1CH
	AUSTROTOXIN-HT1C 1	EY189705	R.NTNCCAGNLTDNDCVCFVWVGNPNK.K	N8	2	5P; 7P
	SCO-SPONDIN	LREC010517	K.GQIYNDTK.D	N5	2	10; 6CH
	SIMILAR TO 5'-NUCLEOTIDASE	EY188412.1	K.VVVCNINATEEPEFER.L	N7	4	5P; 6P; 1CH; 2CH
	SIMILAR TO 5'-NUCLEOTIDASE	EY189687.1 LLAE1315S	R.VTFNVSNPPGER.V	N4	8	5P; 7P; *CH; 10; 1CH; 3CH; *CH; 30
	SIMILAR TO ECHINONECTIN	EY189084.1	K.NASVLSVSSQLSTSSGASR.I	N1	2	5P; 8P;
	SIMILAR TO SPHINGOMYELINASE	EY189200.1	K.ENVTYLDHVR.Q	N2	3	5P; 8P; 1CH
	SIMILAR TO SPHINGOMYELINASE D	EY188595.1	K.CSFQENVTEYLDHIR.Q	N6	1	6P
	SIMILAR TO SPHINGOMYELINASE D (LLSICTOX-IA1)	EY188565.1	R.GFQDAVNSSDPK.E	N7	5	9P; 5P; 6P; 8P; 3P
	SIMILAR TO SPHINGOMYELINASE D (LLSICTOX-IA1)	EY188565.1	R.GFQDAVNSSDPKELYE.V	N7	2	5P; 6P
	TRANSMEMBRANE PROTEIN	EY188453.1 LLAE0081C	K.DLNSGNK.L	N3	1	*O
	NO ANNOTATION**	LREC008288	R.ASDESVLFNDDSNISPOL.-	N13	1	*CH
	PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION**	EY188425.1	K.VIESOGLNLTIR.E	N8	1	5P
	SIMILAR TO HYPOTHETICAL PROTEIN PY00628**	EY188677.1	K.NATOASEFK.H	N1	1	1CH
	VENOMOUS GLAND LIBRARY LOXOSCELES INTERMEDIA CDNA**	EY188650	K.CYYCYCDNWNLNCSCTGK.K	N13	4	9P; 5P; 6P; 3P
	VENOMOUS GLAND LIBRARY LOXOSCELES INTERMEDIA CDNA**	EY188512	K.NQYDVNGTSVSVMSLSFYDDGQK.A	N6	5	5P; *CH; 6P; 8P; 1CH
	VENOMOUS GLAND LIBRARY LOXOSCELES INTERMEDIA CDNA**	EY188512	K.SPWFHCFPNK.T	N9	7	5P; 6P; 8P; 1CH; *P; 2CH; 5CH

Espécie	Proteína	ID da proteína	Sequência do peptídeo	Sítio glicosilado	Nº de glicofomas	ID da glicofoma
	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	HO004251.1	K.NSVATWNYMTNLTEETK.K	N11	5	4P; 5P; *CH; 1CH; *CH
	ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	HO004251.1	K.NSVATWNYMTNLTEETK.I	N11	3	4P; 5P; *CH
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 1	HO002982.1	K.GOENNYDKLDPNK.T	N12	1	5P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 1	HO002982.1	K.GOENNYDKLDPNKTR.T	N12	3	5P; 1CH; 3P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 1	CONTIG039	R.NYVNITR.G	N4	2	7P; 1O
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 1	CONTIG039	R.TDERNYVNITR.G	N8	1	7P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 3	CONTIG128	K.KPGATLVNASLK.H	N8	2	5P; 7P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN 3 PRECURSOR	CONTIG128	K.RFENNTR.V	N4	1	5P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN PRECURSOR	EF028089.1	K.ENIKNGSEHNFDK.L	N5	6	5P; 6P; 1CH; 5CH; 2P; 3P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN PRECURSOR	EF028089.1	K.LWENNTR.T	N4	4	5P; 6P; 1CH; 5CH
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN PRECURSOR	EF028089.1	K.NGSEHNFDK.L	N1	4	5CH; 5P; 1CH; 3P
	ASTACIN-LIKE METALLOPROTEASE TOXIN PRECURSOR	EF028089.1	K.NGSEHNFDKLWENNTR.T	N1/N13	2	1P; 5O
	AUSTROTOXIN-HT1	HO004327.1	K.EGSNCCGDCHYCYCDNWDLNNCSCTGK.K	N22	1	5P
	GTX-VA1	HO003829.1	K.GGESAMFNITK.T	N8	2	7P; 1O
	HYALURONIDASE MRNA	JX402631.1	K.EGQLTNYTLQK.R	N6	2	5P; 6P
	LOXTOX I5 MRNA	EF535254.1	R.NATTPGNPK.Y	N1	12	5P; 7P; 8P; 1CH; 5CH; 2S; 1Q; 2Q; 2P; 3Q; 3P; 4P;
	LOXTOX I5 MRNA	EF535254.1	R.NATTPGNPKYR.D	N1	1	2P
	NEUREXIN-4 ISOFORM X1	LREC019941	R.NITAIATQGR.P	N1	5	5P; 7P; 1CH; 3P; 4P
	PHOSPHOLIPASE A2	LREC009947	R.AHDLCDNLTAPGATR.N	N6	2	5P; 8P
	PHOSPHOLIPASE A2	LREC009947	R.NNLTNNSPFTK.L	N2	1	5P
	SCO-SPONDIN	LREC010517	K.GQYNDTK.D	N5	4	7P; 1O; 3CH; 6CH
	SCO-SPONDIN	EY188511.1 LLAE0139C	K.NYTFEK.I	N1	4	5P; 6P; 1CH; 2CH
	SIMILAR TO 5'-NUCLEOTIDASE	EY189687.1 LLAE1315S	R.VTFNVSPPGER.V	N4	2	*CH;
	SIMILAR TO TRYPSIN-LIKE SERINE PROTEASE	EY189603.1	R.ENDTRPLCK.C	N2	4	9P; 5P; 6P; 3P
	SIMILAR TO TRYPSIN-LIKE SERINE PROTEASE	EY189603.1 LLAE1231S	R.RENDRPLCK.C	N3	6	9P; 5P; 6P; 1CH; 2P; 3P
	TRANSFERRIN	LREC003889	R.AAAVAEFFDAGSCVPGANDTK.Y	N18	1	7P
	TYROSINE-PROTEIN PHOSPHATASE 69D ISOFORM X1	LREC004720	R.HNNVLVANK.T	N8	1	5P
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5***	CONTIG134	K.GNCTIVDNVIHIIHYHDQFCGR.R	N2	1	6P
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5***	HO004178.1	C.ECHNNCTYACR.H	N5	3	*CH; 3CH; 6CH
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5***	CONTIG073	K.DDCCGDCHYCYCDNWNMNNCSCTGK.K	N19	4	8P; *O; 5P; 3P
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5***	CONTIG168	K.ECKENGACTEGSECCTENCR.C	N5	1	3P
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5***	CONTIG013	K.EGSNCCGDCHYCYCDNWNLNNCSCTGK.K	N22	5	5P; 6P; 1CH; 2S; 3P
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5***	CONTIG100	R.CCSPYQCQGDYHCGCYNNCTFGCR.H	N19	15	*P; 9P; 5P; 7P; *CH; 6P; 8P; 3CH; 2O; 2S; 3Q; *S; 3P; 4P
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5***	HO004178.1	-CECHNNCTYACR.H	N6	8	*CH; 6P; 1CH; 3CH; 4CH; 6CH; 5CH
	HYPOTHETICAL PROTEIN C0J52**	LREC005283	K.IKNASLNDTAK.R	N3	1	7P
	HYPOTHETICAL PROTEIN FR6**	CONTIG203	K.SPWFHCFPNK.T	N9	5	5P; 6P; 1CH; 2CH; 5CH
	HYPOTHETICAL PROTEIN X975**	HO002886.1	K.KVIESQGLNLTVR.E	N9	2	5P; 6P
	HYPOTHETICAL PROTEIN X975**	HO002886.1	K.VIESQGLNLTVR.E	N8	3	5P; 6P; 1CH
	NO ANNOTATION**	HO003784.1	K.GINFLNCSNHCGR.L	N6	9	9P; 5P; 7P; 6P; 8P; 1CH; *O; 5CH; 3P
	NO ANNOTATION**	HO003784.1	K.CNCTTDAGCK.C	N2	1	3P
	NO ANNOTATION**	HO003784.1	R.QEPGTPACGPNSPPGCSGFNGTCNNASGK.K	N20	1	9P
	NO ANNOTATION**	HO003440.1	R.QEPGTPACGPNSPPGCSGFNGTCNNASGK.K	N20	5	2CH; 8P; 1O; *O; 2O
	VENOMOUS GLAND LIBRARY LOXOSCELES INTERMEDIA CDNA**	EY188650	K.CYYCYCDNWNLNNCSCTGK.K	N13	1	*CH

Tabela 3 - Peptídeos O-glicosilados nos venenos das 3 espécies de *Loxosceles* - Relação das sequências de O-glicopeptídeos detectados em cada espécie sem redundância, o sítio de glicosilação na sequência, e a proteína referente ao peptídeo.

Espécie	Proteína	ID da proteína	Sequência do peptídeo	Sítio glicosilado	Nº de glicoformas
<i>L. gaucho</i>	LOXTOX S1B LOXTOX PROTEIN MRNA	KU891937.1	K.DEGHEELLDKVGYDFSGNDDISDVQK.	S16/S22	9
	LOXTOX S3A LOXTOX PROTEIN MRNA	KU891946.1	R.NATLPGNPK.F	T3	2
	SPHINGOMYELINASE D-LIKE PROTEIN (SICTOX)	KM363214.1	K.EGHEDLLEKVGHDVDFSGNDDISDVQK.A	S15/S21	2
	ZINC FINGER HOMEODOMAIN PROTEIN 4	LREC000405	R.ASPTSQQQMCERR.A	T4/S5	2
	ZINC FINGER HOMEODOMAIN PROTEIN 4	LREC000405	R.ASPTSQQQMCER.R	S5	1
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5'***	CONTIG100	R.CCSPYQCQCGDYHCGCYNNCTFGCR.H	S21	1
<i>L. intermedia</i>	LOXTOX I5 MRNA; COMPLETE CDS	EF535254.1	R.NATTPGNPK.Y	T4	2
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5'***	HO004178.1	C.ECHNNCTYACR.H	T17	1
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5'***	CONTIG073	K.DDCCGDCHYCYCDNWNMNNCSCTG.S	S21	1
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5'***	CONTIG100	R.CCSPYQCQCGDYHCGCYNNCTFGCR.H	S3/T21	14
	CDNA LIBRARY LOXOSCELES LAETA CDNA 5'***	CONTIG052	R.CHNACQGSSSHVTVDTQYNGPDL.-	T14	1
<i>L. laeta</i>	SIMILAR TO 5'-NUCLEOTIDASE	189687.1 LLAE131	R.SSEEHTTQTISMTTE.R	T6/T7	2

**Proteínas hipotéticas, sem anotação ou função definida.

Como pode ser observado, o número de peptídeos N-glicosilados (Tabela 2) foi consideravelmente maior do que os O-glicosilados (Tabela 3). Isso está condizente com o resultado do ELLA em que foi visto uma menor reatividade do veneno para lectinas com especificidade para carboidratos frequentemente associadas à O-glicosilação, como N-acetilgalactosamina, galactose e ácido siálico. Além disso, dados tanto putativos quanto experimentais disponíveis no Uniprot/SwissProt mostram uma menor frequência de O-glicosilação em venenos de diversos táxons, 5,8% comparado com 94,2% de N-glicosilação (DE MELO-BRAGA *et al.*, 2022; VENOMZONE, 2021). Contudo, esse dado pode estar subestimado dada as limitações de análise de O-glicopeptídeos que o Byonic possui (KAWAHARA *et al.*, 2021).

No geral, os glicopeptídeos podem ser encontrados exclusivos a alguma das espécies analisadas, mas há alguns compartilhados entre elas, como pode ser observado na Figura 10. Dentre as sequências N-glicosiladas, 3 são compartilhadas entre as três espécies: GQIYnDTK, VTFnVSNPPGER, SPWFHCPnK, que correspondem a SCO-Spondina, 5' nucleotidase, e uma proteína sem anotação, respectivamente. Já dentre as sequências O-glicosiladas não houve nenhuma sequência compartilhada entre as três espécies, e apenas uma compartilhada entre *L. intermedia* e *L. gaucho* sendo ela CCsPYQCQCGDYHCGCYNNCTFGCR também sem anotação. Portanto, por essa análise observa-se que a maioria dessas

sequências foram identificadas exclusivas de cada espécie nas amostras analisadas.

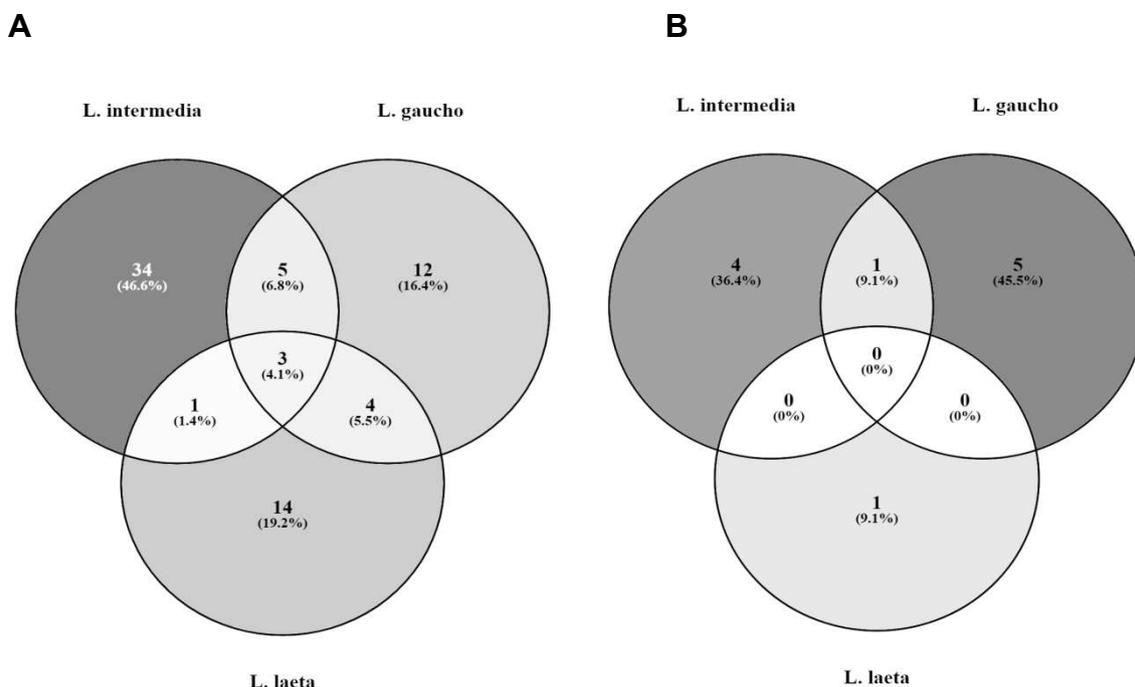


Figura 10 - Sequências de peptídeos glicosilados exclusivos e compartilhados entre as espécies de *Loxosceles*. Diagrama de Venny com o número e porcentagem das sequências de peptídeos N-glicosiladas (A) e O-glicosiladas (B) exclusivas e compartilhadas entre as espécies.

4.3.2 Sequências de peptídeos glicosilados referente a diversas proteínas com atividade biológica no envenenamento.

Cerca de 19 classes de proteínas foram encontradas glicosiladas por essa análise, são elas: 5'-Nucleotidase, Austratoxina-HT1, Ciclofilina, Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), Fosfolipase A2, Fosfolipase D, Fosfatase alcalina, GTX-VA1, Hialuronidase, Metaloprotease, Neurexina, Proteína transmembrana, Proteína transportadora, SCO-Spondina, Serino protease, SLIT-Like protein, Tirosina fosfatase, Transferrina e Zinc Finger Homeobox 4 (ZFHX4). Algumas destas são importantes toxinas com atividade biológica já bem estabelecidas e serão discutidas mais adiante

Como pode ser observado na Figura 11A, a maioria dos peptídeos glicosilados (30%) foram encontradas em peptídeos referentes a proteínas hipotéticas, cDNA, sem função definida ou sem anotação, agrupadas no gráfico como “sem anotação”.

Isto indica que o nosso conhecimento acerca da composição do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* é limitado. Em 2008, Fernandes-Pedrosa e colaboradores, descreveram 24,6 % de proteínas “no hits” no veneno de *L. laeta*. Desde então, outros grupos trabalharam na análise dos transcriptomas de diferentes espécies de *Loxosceles* e forneceram mais informações (DANTAS et al., 2016; GREMSKI et al., 2010; MEDINA-SANTOS et al., 2022). No entanto, as sequências de proteínas do gênero *Loxosceles* depositadas nos bancos de dados públicos ainda não abrangem a diversidade desta peçonha. Além disso, a função e os componentes da glândula de veneno das espécies de importância médica deste gênero não estão completamente definidos e caracterizados.

Contudo, há uma considerável presença de peptídeos glicosilados em outras classes de toxinas encontradas nas três espécies (Figura 11). Depois do grupo de toxinas sem anotação, a família de proteínas que apresenta a maior porcentagem de peptídeos glicosilados encontradas nas amostras analisadas são as fosfolipases D, 16% do glicoproteoma das três espécies (Figura 11A). A presença de glicosilação nestas toxinas foi observada com maior abundância em *L. gaucho* (30%), seguido por *L. laeta* (18,2%), mas também encontrada em *L. intermedia* (6,3%) (Figura 11B, 11D e 11C respectivamente).

As fosfolipases D, ou esfingomielinases D, são a família de toxinas com mais foco de estudos na busca pelo entendimento do envenenamento por *Loxosceles* portanto, melhor caracterizadas bioquimicamente. Além de ser encontrada em abundância nas análises transcriptômicas e proteômicas (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008; GREMSKI et al., 2010; MEDINA-SANTOS et al., 2022; MORGON et al., 2016; TREVISAN-SILVA et al., 2017), já foram descritas por serem altamente imunogênicas e associadas aos principais efeitos clínicos do loxoscelismo, como a dermonecrose (ALVARENGA et al., 2003; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI et al., 1998; GUILHERME; FERNANDES; BARBARO, 2001).

Diversos peptídeos pertencentes a diferentes proteoformas da fosfolipase D foram encontrados glicosilados neste trabalho. Essas proteoformas são S3A, S7A, S9A, S1B, S8B, S11B e a I5 (Tabela 2 e 3), que foram identificadas e descritas em diferentes espécies de *Loxosceles* e podem exibir diferentes funções no mecanismo do envenenamento (DANTAS et al., 2016; KALAPOTHAKIS et al., 2007). Alguns

grupos identificados, como o S1 e S3 apresentam atividade de esfingomielinase semelhante, como permeabilidade dos vasos, agregação plaquetária, hemólise e dermonecrose (KALAPOTHAKIS et al., 2007; SILVESTRE et al., 2005; TAMBOURGI et al., 2004) . Já os grupos 7, 8 e 9 ainda não possuem suas funções definidas, enquanto nos grupos 10, 11 e 12, foi verificada baixa atividade dermonecrótica e, portanto, podem apresentar preferência por outros substratos ou ainda não serem capazes de manifestar tais sinais e sintomas (BERTONI DA SILVEIRA et al., 2006; DANTAS et al., 2016; LEAL et al., 2020).

Outro grupo de proteína com importante atividade biológica no envenenamento que foi encontrada glicosilada nessa análise é o das astacin-like metaloproteases. Peptídeos glicosilados dessas proteínas foram observados principalmente em *L. intermedia* (20,8%), mas também em *L. gaucho* (3,3%) e *L. laeta* (9,1%) (Figura 11C, 11B, 11D, respectivamente) sendo a toxina com atividade biológica conhecida no envenenamento com a 2º maior porcentagem vista no glicoproteoma total das três amostras analisadas (13%) (Figura 11A). Como exposto anteriormente, a ação das metaloproteases em componentes da matriz extracelular tem como principal efeito no envenenamento a propagação da lesão e evolução dos quadros clínicos do loxoscelismo (DA SILVEIRA et al., 2007; TREVISAN-SILVA et al., 2010).

A glicosilação nessa proteína já foi identificada em toxinas de outros animais como serpentes do gênero *Bothrops* (ASEGA et al., 2014; BRÁS-COSTA et al., 2022b) e apontada como potente alvo de glicosilações em venenos de *Loxosceles* (DA SILVEIRA et al., 2007; TREVISAN-SILVA et al., 2010). Além do que, foram observadas alterações em atividades enzimáticas, como a gelatinolítica, após remoção de cadeias de carboidratos de venenos de *Bothrops* e de *L. intermedia* (BRÁS-COSTA et al., 2022a; VEIGA et al., 1999) o que reforça a importância da glicosilação nessa proteína.

Além dessas, também foram encontrados, em menor número, glicopeptídeos referentes à proteína 5' nucleotidase em todas as espécies, correspondendo a 6% do glicoproteoma das três espécies nesta análise (Figura 11A). Essa enzima também não é encontrada com abundância nos transcritos de *L. laeta*, sendo incluída no grupo de “outras atividades do veneno” junto a outras proteínas que representam apenas 5% do total de transcritos das glândulas de veneno desta

espécie (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008). A atividade anticoagulante do veneno é associada a proteína 5' nucleotidase pois esta atua na inibição da agregação plaquetária realizando a depleção de ADP (adenosina difosfato) plasmática e também interage com outros fatores anticoagulantes e trabalham em sinergia com outras enzimas como fosfolipases e ADPases (BOFFA, 1974; DHANANJAYA et al., 2006; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010; JORGE DA SILVA; D. AIRD, 2001; KINI; EVANS, 1990; OUYANG, 1983).

Assim como a 5' nucleotidase, a SCO-spondina foi identificada glicosilada no veneno das três espécies, mas principalmente em *L. intermedia*. Seus glicopeptídeos correspondem a 4% (Figura 11D) do glicoproteoma total. Esta é uma glicoproteína conhecida pelo seu papel modulador, secretada pelo órgão subcomissural (SCO, em inglês). Sua função no envenenamento não está bem definida pois, dada sua capacidade de se ligar a várias proteínas extracelulares e possuir diferentes formas de interação celular, pode exibir múltiplas funções, como participar de eventos de angiogênese, agregação plaquetária, e cicatrização (GOBRON et al., 1996; SAGE; BORNSTEIN, 1991).

Como mencionado na introdução, as glicosilações em proteínas no geral podem favorecer a interação com outras moléculas, e, portanto, podem afetar a atividade da proteína. Contudo, ainda não há estudos funcionais que confirmem o papel dessa modificação na enzima 5' nucleotidase e na SCO-spondina.

Outra proteína encontrada glicosilada no veneno das três espécies nesta análise foi a enzima conversora de angiotensina (ECA). Seus glicopeptídeos correspondem a 8% do glicoproteoma total (Figura 11A), mas foram identificados principalmente no veneno de *L. laeta* (18,2%) (Figura 11D). Não há informações substanciais sobre a presença desta enzima nos transcritos disponíveis de *Loxosceles*, porém já foi descrita no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (CAJADO-CARVALHO et al., 2016) e em transcriptoma da aranha *Cupiennius salei* (KUHN-NENTWIG et al., 2019). A ECA atua principalmente na clivagem da angiotensina I, bradicinina e hemopressina, e há relatos na literatura de estar relacionada à capacidade de captura e morte das presas desses animais (CAJADO-CARVALHO et al., 2016).

Adicionalmente, outras proteínas já descritas com importante atividade nos efeitos do envenenamento também foram encontradas nos venenos de duas ou uma

espécie apenas. Esse foi o caso, por exemplo, das serino-proteases, encontradas glicosiladas em *L. intermedia* e *L. gaucho* correspondendo a 4% dos glicopeptídeos encontrados nas três espécies (Figura 11A). Como anteriormente discutido, essa proteína faz parte do grupo das astacinas, junto com as metaloproteases, e contribuem para a atividade gelatinolítica da peçonha (VEIGA et al., 2000). Nestas duas espécies e com a mesma porcentagem também foi observada a presença de glicopeptídeos referentes à fosfolipase A2, toxina presente em vários tipos de venenos. Em *Loxosceles*, a proteína tem seu efeito associado aos efeitos inflamatórios como edema e isquemia do tecido atingido, além de poder contribuir para evolução do quadro víscero-cutâneo (DOS SANTOS et al., 2009; FULY et al., 2007; STRAUCH et al., 2013).

Outro exemplo com destaque entre esses achados foi da hialuronidase, identificada apenas em *L. intermedia* e em apenas 1% dos glicopeptídeos, assim como também aparece em baixa abundância no transcriptoma relatado por Gremski e colaboradores em 2010. Porém, seu papel de dispersão do veneno é bem descrito tanto em *Loxosceles* quanto em outros animais peçonhentos (GIRISH et al., 2004; GIRISH; KEMPARAJU, 2007; KEMPARAJU; GIRISH, 2006; KREIL, 1995).

A presença de glicosilações em peptídeos referentes a essas proteínas anteriormente citadas fortalece a hipótese de que essa modificação pós-traducional tenha um importante impacto na atividade biológica do veneno e lança uma luz sobre o inexplorado glicoproteoma de aranhas do gênero *Loxosceles*. Contudo é algo que ainda precisa ser investigado e testado experimentalmente, principalmente quanto aos efeitos de dermonecrose, propagação da lesão, agregação plaquetária e anticoagulação associado às proteínas individualmente

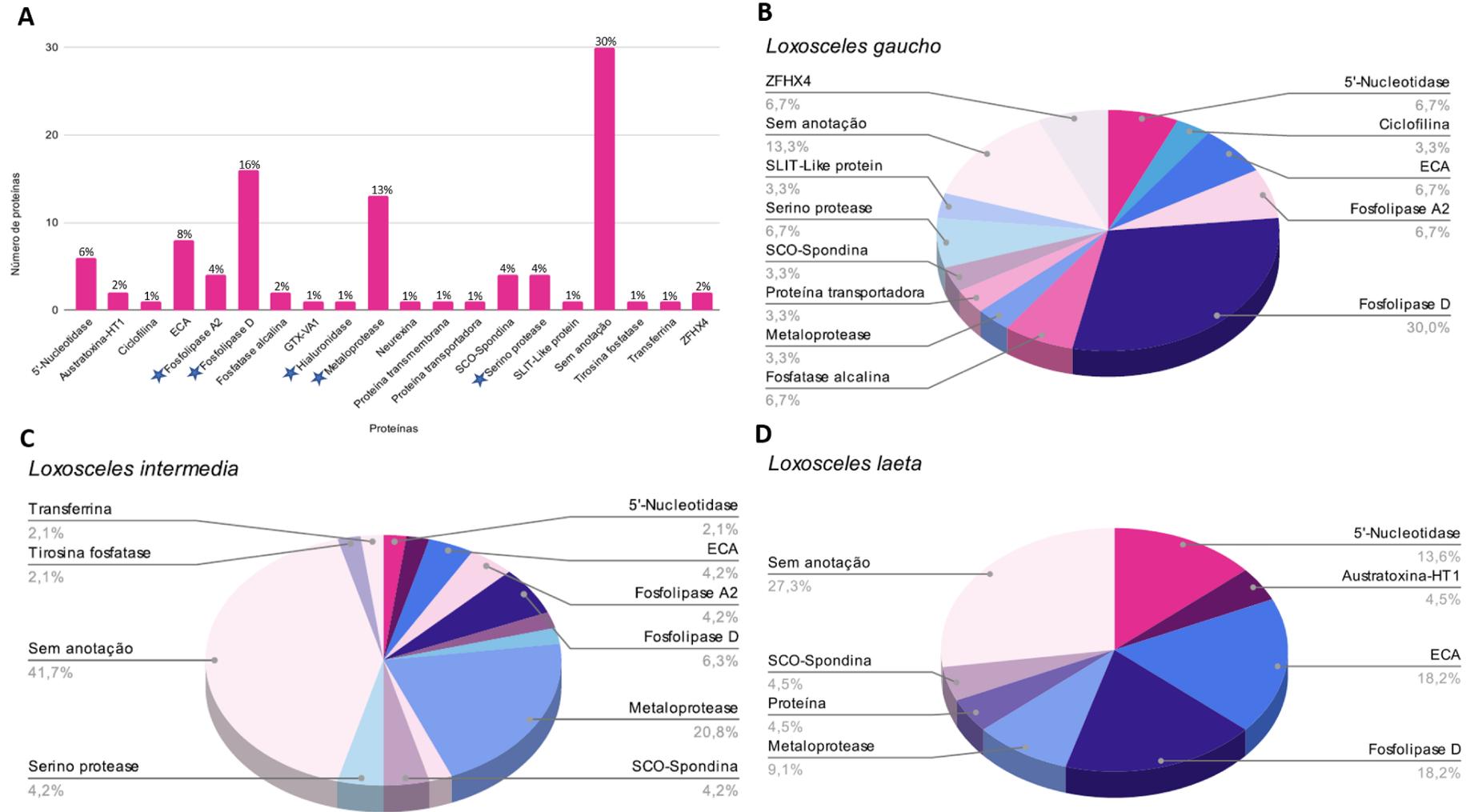


Figura 11 - Análise qualitativa do glicoproteoma do veneno de *Loxosceles*. Número e porcentagem de peptídeos N e O-glicosilados relacionados por classes de proteínas encontradas nas três espécies de *Loxosceles* (A) e individualmente, *L. gaucho* (B), *L. intermedia* (C) e *L. laeta* (D). As estrelas marcam um destaque para as toxinas descritas com importante atividade biológica no envenenamento. A maioria das glicosilações encontradas estão em proteínas hipotéticas, sem função definida ou sem anotação, agrupadas todas no grupo “sem anotação” do gráfico, mas há também um considerável número de glicopeptídeos referentes a fosfolipases D e metaloproteases.

4.3.3 Caracterização da complexidade das estruturas de N-glicosilações

É incontestável o quanto o glicoma é diverso, envolvendo diferentes tipos de glicoconjugados, oligossacarídeos com várias composições, sequências e ligações de carboidratos, o que torna a heterogeneidade do glicoma bastante complexa. Contudo, apesar dessa diversidade, os glicoconjugados compartilham algumas características, como as bases estruturais comuns e modificações terminais (CUMMINGS, 2009) o que torna possível seu estudo e entendimento.

Diante disso, buscou-se nessa análise compreender algumas particularidades das características das estruturas de glicosilações encontradas nos peptídeos mencionados anteriormente. Como pode ser visto na Figura 12, a maioria dos peptídeos N-glicosilados possuem 1 estrutura de carboidrato sem redundância associadas a cada um deles e foi observado esse padrão no veneno das 3 espécies analisadas. Contudo, em algumas espécies como *L. intermedia*, em uma única sequência foram encontradas 8, 9, 12 e até 15 diferentes estruturas de N-glicosilações. Sendo que o peptídeo nATTPGNPK com 12 diferentes estruturas é referente a uma proteoforma conhecida da fosfolipase D, a Loxtox I5 (Tabela 2). Essa proteoforma foi identificada por Kalapothakis e colaboradores em 2007 e não possuía dados de ensaio biológico da sua atividade, porém foi observada também em outro estudo que possuía 63% de identidade com a proteoforma P2-(AY304472, P83046, AAP97092), na qual foi observada alta atividade dermonecrótica, esfingomielinásica e hemolítica (TAMBOURGI et al., 2004).

Um outro achado de destaque nessa análise foi a presença de 22 glicoformas no peptídeo nATLPGNPK encontrado no veneno de *L. gaucho* e também referente a outra proteoforma de fosfolipase D, a Loxtox S3A (Tabela 2). Dantas e colaboradores identificaram essa proteoforma no veneno de *Loxosceles similis* em 2016 e assim como discutido anteriormente, o grupo S3 também apresentou atividades importantes envolvidas nos efeitos clínicos do envenenamento (DANTAS et al., 2016).

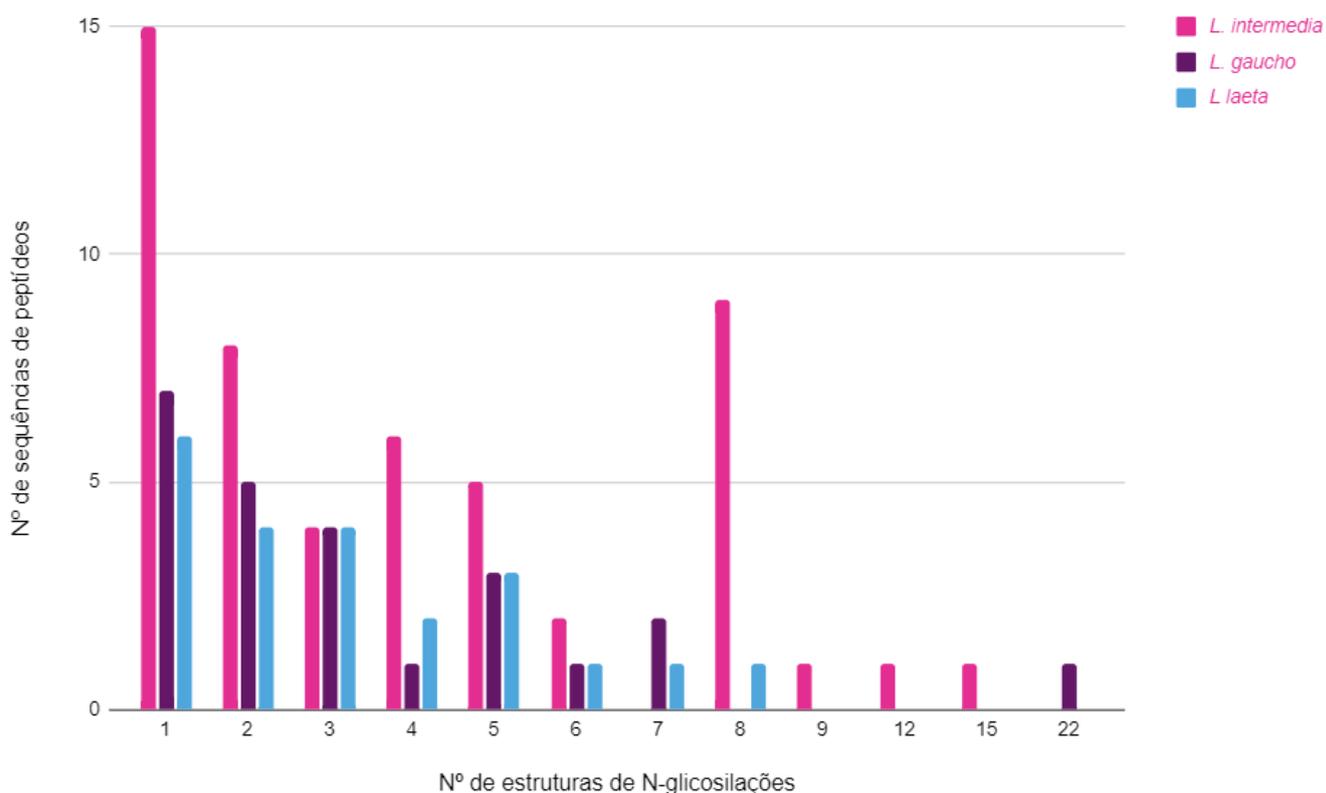


Figura 12- Número de estruturas de N-glicosilações por sequência de peptídeo nos venenos de *Loxosceles*. No gráfico está representado o número de glicofomas encontradas em cada peptídeo de cada espécie. A maioria das sequências de peptídeo tem 1 a 3 estruturas de glicanos, porém há alguns peptídeos no veneno de *L. intermedia* com 8, 9, 12 e até 15 estruturas presentes. E no veneno de *L. gaucho* foi encontrada até 22 glicoproteoformas associadas a um único peptídeo.

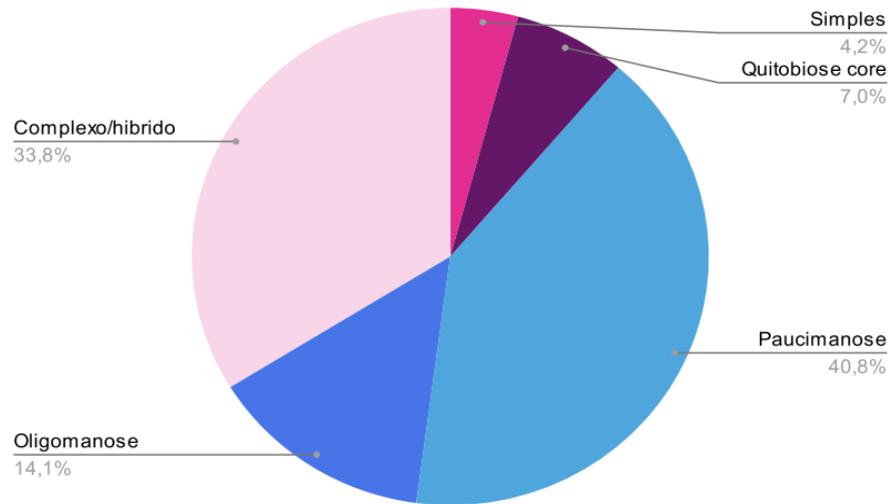
Essas estruturas foram classificadas quanto a sua classe de N-glicosilação, porém incluímos também estruturas que denominamos de simples por conterem apenas um N-acetilglicosamina podendo estar ligada ou não a fucose. Foi observado, considerando as 3 espécies, um maior número de estruturas do tipo paucimanose (40,8%) seguido de uma quantidade significativa de glicanos complexos/híbridos (33,8%) (Figura 13A). Oligomanoses, ou estruturas com alto teor de manoses, também foram observadas nas três espécies com proporções semelhantes (Figura 13B). Estruturas do tipo simples e de núcleo quitobiose não foram encontradas na amostra do veneno de *L. laeta* e também foi vista em menor proporção se comparada com as demais nos venenos de *L. gaucho* e *L. intermedia* (Figura 13B).

A maquinaria onde ocorre a biossíntese de glicosilação influencia na composição das estruturas. Até onde sabemos, não existe nenhum estudo sobre esse processo

em aracnídeos, classe em que pertencem as aranhas. Portanto, temos como base de comparação tipos de glicosilações encontradas em insetos, também pertencentes ao filo Arthropoda. Em geral, os resultados obtidos nessa análise são semelhantes ao de estudos de glicosilações em insetos (DE SOUZA et al., 2019; WALSKI et al., 2017). Este é o caso, da abundância de paucimanoses, além da frequente presença de N-acetilglicosaminas, manoses, fucoses centrais e uma diversidade de tipos de glicanos terminais, que podem ser vistos com mais detalhes na Figura 14. Contudo, ao contrário do que já foi observado em insetos, mas similar ao já visto em toxinas de serpentes (ANDRADE-SILVA et al., 2018), por esta análise dos venenos de aranha-marrom foram encontradas muitas estruturas complexas/híbridas.

Foi proposto que N-glicanos ricos em manose podem atuar como moléculas semelhantes a chaperonas e auxiliar no dobramento correto de proteínas, e que por meio de interações hidrofóbicas, estruturas do tipo complexo desempenham um papel crucial na estabilidade (JITSUHARA et al., 2002). Portanto, a presença de estruturas com alto teor de manose e do tipo complexo em diversas fontes sugere um possível impacto no enovelamento e estabilidade das proteínas, e consequente modulação da atividade biológica, já que foi observada a presença dessas estruturas em toxinas com grande importância no envenenamento.

A



B

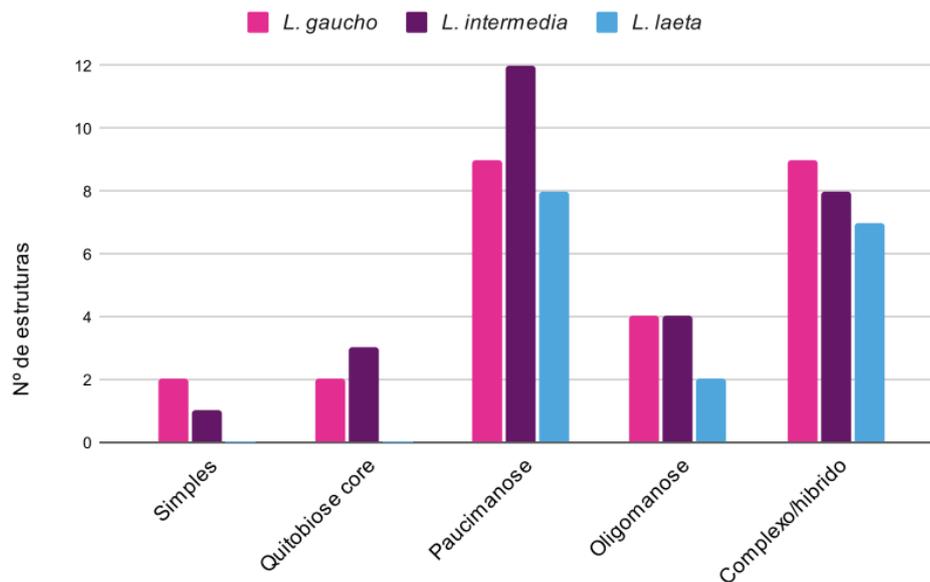


Figura 13 - Classificação das estruturas de N-glicosilações encontradas nas 3 espécies de *Loxosceles*. As estruturas encontradas foram classificadas em 5 grupos: simples, quitobiase core, paucimanose, oligomanose e complexo/híbrido. A) Distribuição dessas estruturas considerando as três espécies analisadas e B) em cada espécie. Foram consideradas estruturas simples aquelas que apresentam apenas um N-acetilglicosamina ligada ou não a fucose.

Utilizando a ferramenta SugarBind (<https://sugarbind.expasy.org/builder>) foi montado manualmente, de acordo com as informações de composição de glicanos obtidas no Byonic, as estruturas de carboidrato encontradas em peptídeos referentes às toxinas das três espécies com grande importância nos efeitos clínicos do loxoscelismo (Figura 14 e Tabela 2), ao qual denominamos um ID específico para cada glicoforma.

Foram encontradas um total de 26 diferentes estruturas de N-glicosilação considerando as famílias de toxinas fosfolipases D, fosfolipase A2, hialuronidase, serino-protease e metaloprotease (Figura 14). Todos os tipos de estrutura, exceto a HexNAc(2)Hex(5)Fuc(2) (ID da glicoforma: 5O), foram observadas em glicopeptídeos referentes a proteoformas da fosfolipase D no veneno de pelo menos uma das espécies, mas, grande parte das vezes, nas três espécies. Além disso, estruturas do tipo simples e de núcleo quitobiose foram vistas somente nesta classe de proteína. Uma significativa diversidade de estruturas também foi observada em glicopeptídeos referentes a metaloproteases, com 12 das 26 estruturas presentes nessa família de toxina.

Alguns tipos de glicanos foram comuns a grande parte das proteínas e apareceram com frequência nas 3 espécies, como o caso do HexNAc(2)Hex(3)Fuc(1) (ID da glicoforma: 5P) e HexNAc(3)Hex(3)Fuc(1) (ID da glicoforma: 1CH) (Tabela 2 e Figura 14). Como pode ser observado nas estruturas de glicosilações montadas, todas possuem pelo menos um resíduo de N-acetilglicosamina ligados ou não a fucoses. Além disso, os 9 tipos de paucimanoses encontrados tiveram ligados a dois resíduos de N-acetilglicosamina e de 1 a 4 manoses, enquanto nas estruturas ricas em manose, as oligomanoses, variaram de 5 a 8 resíduos de manose ligados a duas N-acetilglicosaminas.

De um modo geral, os tipos de carboidratos encontrados por essa análise corroboram com o que foi observado pelo ELLA com lectinas, exceto pela presença de fucoses, que não foi vista no ELLA. A lectina utilizada neste ensaio para detecção de fucoses (UEA I) possui especificidade de ligação para glicocompostos contendo α -(1,2)-fucose (SHARMA; SCHUMACHER; ADAM, 1998). Em geral, a fucose mais difundida em N-glicanos de invertebrados é a ligada ao núcleo α 1,3/1,6 (ISKRATSCHE et al., 2009; PASCHINGER et al., 2005). Embora não tenha sido

possível determinar o tipo de fucose encontrada nesta análise, a especificidade de ligação da UEA e a possível presença de outros tipos de ligação de fucose no veneno de aranhas é uma provável explicação para a divergência encontrada nestes resultados.

Dada algumas limitações da técnica, não foi possível estabelecer exatamente qual tipo de carboidrato presente em algumas estruturas como nos IDs 3, 4, 6 e 7CH (Figura 14), podendo estar ligado ao carboidrato anterior um resíduo de manose ou galactose, por isso a utilização do ponto de interrogação. Além disso, em alguns casos como nas estruturas dos IDs 1 e 2CH, a utilização do símbolo chave representa que a ligação da N-acetilglicosamina pode ser em qualquer uma das duas manoses anteriores.

Assim como todas as técnicas anteriores, a análise de glicopeptídeos intactos pela estratégia *bottom-up* com enriquecimento por HILIC e a busca feita contra um banco de sequências limitado, pode não representar toda complexidade do glicoproteoma das espécies estudadas. Contudo, o número e a diversidade de glicanos encontradas neste trabalho é condizente com o observado em venenos de outros animais como serpentes.

Andrade-Silva e colaboradores, por exemplo, encontraram 60 estruturas diferentes de N-glicanos no veneno de 8 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* fazendo uma análise dos N-glicanos deglicosilados por PNGase F (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018). Os tipos de estruturas e resíduos de carboidratos observados também é semelhante ao encontrado em outros venenos de serpentes e artrópodes (BRÁS-COSTA *et al.*, 2022b; GOWDA; DAVIDSON, 1992; KOLARICH *et al.*, 2005; VALDEZ-CRUZ; BATISTA; POSSANI, 2004; VERANO-BRAGA *et al.*, 2013), exceto pela presença de ácido siálico, não observados nas estruturas de N-glicosilação no presente trabalho. Visto que foi detectada uma reatividade para ácido siálico (2-6) no veneno de duas das espécies analisadas pelo ELLA neste trabalho, acreditamos que essa informação pode ter sido perdida pelo tipo de enriquecimento utilizado, HILIC, pois como descrito por Palmisano e colaboradores em 2010, uma combinação desta com o enriquecimento com Dióxido de Titânio (TiO₂) poderia alcançar uma análise mais abrangente de glicopeptídeos sialilados (PALMISANO *et al.*, 2010). Contudo, mais provavelmente, isso também pode ser explicado pelo fato de que os 38 tipos

de N-glicosilação em insetos disponível no Byonic e incluídos na busca não inclui estruturas com ácido siálico.

A presença confirmada por mais essa abordagem de vários tipos de N-glicosilações, reforça a complexidade, pelo menos parcial, do glicoproteoma de aranhas do gênero *Loxosceles*. Esses achados nos dão algumas informações experimentais sobre a importância dessa modificação na diversidade do perfil proteômico do veneno, produzindo proteoformas com possíveis diferentes propriedades, como também podem contribuir para futuros estudos do impacto da estrutura de carboidratos nas funções dessas toxinas encontradas glicosiladas (SPIRO, 2002; VARKI, 2016).

Tipo	ID da glicoforma	N-Glicoformas							
			Fosfolipases D	Fosfolipase A2	Hialuronidase	Serproteíase	Metaloprotease		
Simples	1S	HexNAc(1) 	X					<i>L. gaucho</i>	
	2S	HexNAc(1)Fuc(1) 	X					<i>L. gaucho</i>	
Quitobiase core	1Q	HexNAc(2) 	X					<i>L. gaucho</i>	
		HexNAc(2)Fuc(1) 	X					<i>L. gaucho</i>	
	2Q	HexNAc(2)Fuc(1) 	X					<i>L. gaucho</i>	
		HexNAc(2)Fuc(2) 	X					<i>L. gaucho</i>	
	3Q	HexNAc(2)Fuc(2) 	X					<i>L. gaucho</i>	
		HexNAc(2)Hex(1) 	X					<i>L. gaucho</i>	
Paucimanose	1P	HexNAc(2)Hex(1) 	X				X	<i>L. intermedia</i>	
	2P	HexNAc(2)Hex(1)Fuc(1) 	X					<i>L. gaucho</i>	
		HexNAc(2)Hex(2)Fuc(1) 	X				X	<i>L. intermedia</i>	
	3P	HexNAc(2)Hex(2)Fuc(1) 	X				X	<i>L. gaucho</i>	
		HexNAc(2)Hex(3) 	X					<i>L. intermedia</i>	
	4P	HexNAc(2)Hex(3) 	X					<i>L. gaucho</i>	
		HexNAc(2)Hex(3)Fuc(1) 	X	X		X			<i>L. gaucho</i>
	5P	HexNAc(2)Hex(3)Fuc(1) 	X	X	X	X	X		<i>L. intermedia</i>
		HexNAc(2)Hex(3)Fuc(2) 	X				X		<i>L. laeta</i>
	6P	HexNAc(2)Hex(3)Fuc(2) 	X				X		<i>L. gaucho</i>
		HexNAc(2)Hex(4) 	X	X					<i>L. intermedia</i>
	7P	HexNAc(2)Hex(4) 	X				X		<i>L. gaucho</i>
HexNAc(2)Hex(4)Fuc(1) 		X	X					<i>L. intermedia</i>	
8P	HexNAc(2)Hex(4)Fuc(1) 	X				X		<i>L. gaucho</i>	
	HexNAc(2)Hex(2)Fuc(2) 	X					X	<i>L. intermedia</i>	
9P	HexNAc(2)Hex(2)Fuc(2) 	X					X	<i>L. laeta</i>	

Tipo	ID da glicoforma	N-Glicofomas						
			Fosfolipase D	Fosfolipase A2	Hyaluronidase	Serpinoprotease	Metalooprotease	
Oligomanose	10	HexNAc(2)Hex(5)	X					<i>L. gaucho</i>
						X		<i>L. intermedia</i>
								<i>L. laeta</i>
	20	HexNAc(2)Hex(6)	X					<i>L. gaucho</i>
								<i>L. intermedia</i>
							<i>L. laeta</i>	
Complexo/Híbrido	1CH	HexNAc(3)Hex(3)Fuc(1)	X	X		X	X	<i>L. gaucho</i>
			X			X	X	<i>L. intermedia</i>
			X				X	<i>L. laeta</i>
	2CH	HexNAc(3)Hex(3)Fuc(2)	X					<i>L. gaucho</i>
							X	<i>L. intermedia</i>
							<i>L. laeta</i>	
Complexo/Híbrido	3CH	HexNAc(3)Hex(4)	X					<i>L. gaucho</i>
								<i>L. intermedia</i>
							<i>L. laeta</i>	
	4CH	HexNAc(3)Hex(4)Fuc(1)	X					<i>L. gaucho</i>
								<i>L. intermedia</i>
							<i>L. laeta</i>	
	5CH	HexNAc(4)Hex(3)Fuc(1)	X					<i>L. gaucho</i>
		X				X	<i>L. intermedia</i>	
							<i>L. laeta</i>	
6CH	HexNAc(3)Hex(5)	X					<i>L. gaucho</i>	
							<i>L. intermedia</i>	
							<i>L. laeta</i>	
7CH	HexNAc(3)Hex(5)Fuc(1)	X					<i>L. gaucho</i>	
							<i>L. intermedia</i>	
							<i>L. laeta</i>	



Figura 14 - Estruturas de N-glicosilações encontradas nas principais proteínas com atividade biológica no envenenamento de *Loxosceles*. Foi gerado pela ferramenta SugarBind (<https://sugarbind.expasy.org/builder>) os 26 tipos de estruturas de N-glicanos identificadas em cinco famílias de proteínas. Está representado nessa tabela as estruturas, sua respectiva classificação, em que família de proteína e no veneno de qual espécie foram identificadas. O símbolo de chave representa que o carboidrato pode estar ligado a qualquer um dos carboidratos anteriores e o ponto de interrogação é a possibilidade de ser um resíduo ou outro. Círculo verde: Manose, quadrado azul: N-Acetilglicosamina, triângulo vermelho: Fucose, círculo amarelo: Galactose.

5- CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi confirmada por diferentes abordagens a presença de glicoproteínas no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. Pela primeira vez, caracterizamos um perfil glicoproteômico do veneno das três espécies de maior importância médica de aranhas deste gênero. Por uma análise mais aprofundada desses venenos, foi observada 88 sequências de peptídeos N-glicosiladas, e 12 O-glicopeptídeos referentes a importantes toxinas com atividade biológica bem descrita no envenenamento, como fosfolipases D e A2, metaloproteases, serino-proteases e hialuronidases, e que pode conter até 22 glicofomas em um único sítio de glicosilação de um peptídeo. A caracterização das estruturas de N-glicanos encontradas demonstrou que há uma alta diversidade destas nos venenos das três espécies, principalmente compostos de paucimanoses, mas também um grande número de estruturas complexas/híbridas, até então vistas em pouca quantidade em artrópodes.

Portanto, este trabalho contribui com informações essenciais para compreensão dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* e lança luz sobre a inexplorada diversidade de glicanos presentes em importantes toxinas responsáveis pelos efeitos clínicos do envenenamento. Desse modo fornece mais alguns indícios da importância das glicosilações no desfecho do envenenamento e pode colaborar com o desenvolvimento de um diagnóstico e melhores formas de tratamento para os sintomas do loxoscelismo, um grave problema de saúde pública no Brasil.

6- PERSPECTIVAS

- Identificação das proteoformas encontradas glicosiladas no gel bidimensional por *In gel digestion* e espectrometria de massa.
- Análise mais aprofundada dos espectros gerados para caracterização das estruturas de O-glicosilação.
- Análise da relação estrutura-função dessas proteínas glicosiladas, principalmente da fosfolipase D.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULKADER, Regina C. R. M.; BARBARO, Katia C.; BARROS, Elvino José Guradão; BURDMANN, Emmanuel A. Nephrotoxicity of Insect and Spider Venoms in Latin America. **Seminars in Nephrology**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 373–382, 2008. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2008.04.006.
2. ALLI, Samira R. et al. An integrated proteomic and transcriptomic analysis reveals the venom complexity of the bullet ant *Paraponera clavata*. **Toxins**, [S. l.], v. 12, n. 5, 2020. DOI: 10.3390/toxins12050324.
3. ALVARENGA, Larissa M.; MARTINS, Maria S.; MOURA, Juliana F.; KALAPOTHAKIS, Evanguedes; OLIVEIRA, Júlio C.; MANGILI, Oldemir C.; GRANIER, Claude; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, Carlos. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, [S. l.], v. 42, n. 7, p. 725–731, 2003. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.09.006.
4. ALVES, Maria Julia Manso; KAWAHARA, Rebeca; VINER, Rosa; COLLI, Walter; MATTOS, Eliciane Cevolani; THAYSEN-ANDERSEN, Morten; LARSEN, Martin Røssel; PALMISANO, Giuseppe. Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 151, p. 182–192, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.05.034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.034>.
5. ANDRADE-SILVA, D. " ASHLINE, D; TRAN T.; LOPES, A.S.; CARDOSO S.R.T.; REIS, M.S.; ZELANIS, A.; SERRANO, S.M.T.; REINOHOLD, V.N.. Structures of N-Glycans of Bothrops venoms revealed as molecular signatures that contribute to venom phenotype in viperid snakes. *Mol Cell Proteomics*, 17(7), 1261-1284, 2018
6. ANDRADE-SILVA, Débora; ZELANIS, André; KITANO, Eduardo S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Inácio L. M.; REIS, Marcelo S.; LOPES, Aline S.; SERRANO, Solange M. T. Proteomic and glycoproteomic profilings reveal that post-translational modifications of toxins contribute to venom phenotype in snakes. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 2658–2675, 2016. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00217.
7. AOKI, Kazuhiro; PORTERFIELD, Mindy; LEE, Samuel S.; DONG, Brian; NGUYEN, Khoi; MCGLAMRY, Katherine H.; TIEMEYER, Michael. The diversity of O-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 44, p. 30385–30400, 2008. DOI: 10.1074/jbc.M804925200. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M804925200>.
8. APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. Bertoni; GREMSKI, W.; VEIGA, Silvio S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 152–158, 2005.
9. ASEGA, Amanda F.; OLIVEIRA, Ana K.; MENEZES, Milene C.; NEVES-FERREIRA, Ana Gisele C.; SERRANO, Solange M. T. Interaction of Bothrops jararaca venom metalloproteinases with protein inhibitors. **Toxicon**, [S. l.], v. 80, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.01.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.01.001>.
10. BARACCHI, D.; MAZZA, G.; MICHELUCCI, E.; PIERACCINI, G.; TURILLAZZI, S.; MONETI, G. Top-down sequencing of *Apis dorsata* apamin by MALDI-TOF MS and evidence of its inactivity against microorganisms. **Toxicon**, [S. l.], v. 71, p. 105–112, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.05.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.020>.
11. BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. LC. Mecanismo de Ação do Veneno de *Loxosceles* e Aspectos Clínicos do Loxoscelismo. **Animais Peçonhentos No Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**, [S. l.], n. 2003, p. 160–174, 2003.
12. BARRETTO, O. C.; CARDOSO, J. L.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 264–267, 1985. DOI: 10.1590/S0036-46651985000500006.

13. BENKHADIR, Khadija; KHARRAT, Riadh; CESTÈLE, Sandrine; MOSBAH, Amor; ROCHAT, Hervé; EL AYEB, Mohamed; KAROUI, Habib. Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: Pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. **Peptides**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 151–161, 2004. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.01.009.
14. BERTONI DA SILVEIRA, Rafael et al. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, [S. l.], v. 88, n. 9, p. 1241–1253, 2006. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.02.008.
15. BOFFA, Marie claire. MARIE-CLAIRE B O F F A * and G E O R G E S A. B O F F A. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S. l.], v. 354, p. 275–290, 1974.
16. BRÁS-COSTA, Carolina; ALENCAR CHAVES, Alison Felipe; TREVISAN-SILVA, Dilza; MENEZES, Milene C.; ROCHA, Marisa M. T.; CAJADO-CARVALHO, Daniela; ANDRADE-SILVA, Débora; SERRANO, Solange M. T. Sialic acid-containing glycans play a role in the activity of snake venom proteases. **Biochimie**, [S. l.], 2022. a. DOI: 10.1016/j.biochi.2022.09.011.
17. BRÁS-COSTA, Carolina; CHAVES, Alison Felipe Alencar; CAJADO-CARVALHO, Daniela; DA SILVA PIRES, David; ANDRADE-SILVA, Débora; SERRANO, Solange M. T. Profilings of subproteomes of lectin-binding proteins of nine Bothrops venoms reveal variability driven by different glycan types. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1870, n. 7, 2022. b. DOI: 10.1016/j.bbapap.2022.140795.
18. BURDA, Patricie; AEBI, Markus. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1426, n. 2, p. 239–257, 1999. DOI: 10.1016/S0304-4165(98)00127-5.
19. CAJADO-CARVALHO, Daniela; KUNIYOSHI, Alexandre Kazuo; DUZZI, Bruno; IWAI, Leo Kei; DE OLIVEIRA, Úrsula Castro; DE AZEVEDO, Inácio De Loiola Meirelles Junqueira; KODAMA, Roberto Tadashi; PORTARO, Fernanda Vieira. Insights into the hypertensive effects of *tityus serrulatus* scorpion venom: Purification of an angiotensin-converting enzyme-like peptidase. **Toxins**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1–16, 2016. DOI: 10.3390/toxins8120348.
20. CHAIM, Olga Meiri et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 211, n. 1, p. 64–77, 2006. DOI: 10.1016/j.taap.2005.05.015.
21. CHANG, Xiaoyu; XU, Bo; BAI, Yingguo; LUO, Huiying; MA, Rui; SHI, Pengjun; YAO, Bin. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0171111.
22. CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, Carlos; ZANETTI, Vera C.; FERREIRA, Ana P.; MINOZZO, João C.; MANGILI, Oldemir C.; GUBERT, Ida C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 563–569, 1998. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00159-1.
23. COUTINHO, Inês; ROCHA, Sónia; FERREIRA, Maria Eugénia; VIEIRA, Ricardo; CORDEIRO, Margarida Robalo; REIS, José Pedro. Loxoscelismo cutâneo em Portugal: Causa rara de dermonecrose. **Acta Medica Portuguesa**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 654–657, 2014. DOI: 10.20344/amp.4891.
24. CUMMINGS, Richard D. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. **Molecular BioSystems**, [S. l.], v. 5, n. 10, p. 1087–1104, 2009. DOI: 10.1039/b907931a.
25. DA SILVA, Paulo Henrique; DA SILVEIRA, Rafael Bertoni; HELENA APPEL, Márcia; MANGILI, Oldemir Carlos; GREMSKI, Waldemiro; VEIGA, Silvio Sanches. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.07.012.
26. DA SILVEIRA, Rafael B. et al. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 406, n. 2, p. 355–363, 2007. DOI: 10.1042/BJ20070363.
27. DANTAS, Arthur Estanislau; CARMO, A. O.; HORTA, Carolina Campolina Rebello; LEAL, Hortênsia Gomes; OLIVEIRA-MENDES, Bárbara Bruna Ribeiro; MARTINS, Ana Paula

- Vimieiro; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, Carlos; KALAPOTHAKIS, Evanguedes. Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland. **Toxicon**, [S. l.], v. 120, p. 97–106, 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.08.002.
28. DE MELO-BRAGA, Marcella Nunes; DA SILVA MOREIRA, Raniele; GERVÁSIO, João Henrique Diniz Brandão; FELICORI, Liza Figueiredo. Overview of protein posttranslational modifications in Arthropoda venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 28, n. August 2021, p. 1–16, 2022. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0047.
 29. DE SOUZA, Caroline Lacerra; DOS SANTOS-PINTO, José Roberto Aparecido; ESTEVES, Franciele Grego; PEREZ-RIVEROL, Amílcar; FERNANDES, Luís Gustavo Romani; DE LIMA ZOLLNER, Ricardo; PALMA, Mario Sergio. Revisiting *Polybia paulista* wasp venom using shotgun proteomics – Insights into the N-linked glycosylated venom proteins. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 200, n. January, p. 60–73, 2019. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.03.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.012>.
 30. DEVARAJA, S.; GIRISH, K. S.; DEVARAJ, V. R.; KEMPARAJU, K. Factor Xa-like and fibrin(ogen)olytic activities of a serine protease from *Hippasa agelenoides* spider venom gland extract. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 119–126, 2010. DOI: 10.1007/s11239-009-0341-3.
 31. DHANANJAYA, B. L.; NATARAJU, A.; RAJESH, R.; RAGHAVENDRA GOWDA, C. D.; SHARATH, B. K.; VISHWANATH, B. S.; D'SOUZA, Cletus J. M. Anticoagulant effect of *Naja naja* venom 5'nucleotidase: Demonstration through the use of novel specific inhibitor, vanillic acid. **Toxicon**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 411–421, 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.06.017.
 32. DHANANJAYA, Bhadrapura L.; D'SOUZA, Cletus J. M. The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. **Cell Biochemistry and Function**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 171–177, 2010. DOI: 10.1002/cbf.1637.
 33. DOS SANTOS-PINTO, José Roberto Aparecido; DOS SANTOS, Lucilene Delazari; ANDRADE ARCURI, Helen; CASTRO, Fábio Morato; KALIL, Jorge Elias; PALMA, Mario Sergio. Using proteomic strategies for sequencing and post-translational modifications assignment of antigen-5, a major allergen from the venom of the social wasp *polybia paulista*. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 855–865, 2014. DOI: 10.1021/pr4008927.
 34. DOS SANTOS, Lucilene; DIAS, Nathalia; ROBERTO, Jose; PINTO, A.; PALMA, Mario. Brown Recluse Spider Venom: Proteomic Analysis and Proposal of a Putative Mechanism of Action. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 933–943, 2009. DOI: 10.2174/092986609788923383.
 35. FABINI, Gustáv; FREILINGER, Angelika; ALTMANN, Friedrich; WILSON, Iain B. H. Identification of core α 1,3-fucosylated glycans and cloning of the requisite fucosyltransferase cDNA from *Drosophila melanogaster*: Potential basis of the neural anti-horseradish peroxidase epitope. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 30, p. 28058–28067, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M100573200.
 36. FEITOSA, Loara; GREMSKI, Waldemiro; VEIGA, Silvio S.; ELIAS, M. Carolina Q. B.; GRANER, Edgard; MANGILI, Oldemir C.; BRENTANI, Ricardo R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 1039–1051, 1998. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00083-4.
 37. FERNANDES-PEDROSA, Matheus de F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Inácio de L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, Rute M.; KOBASHI, Leonardo S.; ALMEIDA, Diego D.; HO, Paulo L.; TAMBOURGI, Denise V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 9, p. 1–12, 2008. DOI: 10.1186/1471-2164-9-279.
 38. FERRER, Valéria Pereira et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 5, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002206.

39. FRANÇA, Francisco Oscar de Siqueira; BARBARO, Katia Cristina; ABDULKADER, Regina C. R. M. Rhabdomyolysis cases in presumed loxoscelism : repot-t of two. **Platelets**, [S. l.], p. 287–290, 2002.
40. FREEZE, Hudson H.; CHONG, Jessica X.; BAMSHAD, Michael J.; NG, Bobby G. Solving glycosylation disorders: Fundamental approaches reveal complicated pathways. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 161–175, 2014. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.10.024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.024>.
41. FULY, André L.; MACHADO, Alexandre L.; CASTRO, Paulo; ABRAHÃO, Agessandro; REDNER, Paulo; LOPES, Ulisses G.; GUIMARÃES, Jorge A.; KOATZ, Vera Lucia G. Lysophosphatidylcholine produced by the phospholipase A2 isolated from Lachesis muta snake venom modulates natural killer activity as a protein kinase C effector. **Toxicon**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 400–410, 2007. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.04.008.
42. FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **American Journal of the Medical Sciences**, [S. l.], v. 304, n. 4, p. 261–267, 1992. DOI: 10.1097/00000441-199210000-00008.
43. GAUNITZ, Stefan; JIN, Chunsheng; NILSSON, Anki; LIU, Jining; KARLSSON, Niclas G.; HOLGERSSON, Jan. Mucin-type proteins produced in the Trichoplusia ni and Spodoptera frugiperda insect cell lines carry novel O-glycans with phosphocholine and sulfate substitutions. **Glycobiology**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 778–796, 2013. DOI: 10.1093/glycob/cwt015.
44. GAVEL, Ylva; HEIJNE, Gunnar Von. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated asn-x-thr/ser acceptor sites: Implications for protein engineering. **Protein Engineering, Design and Selection**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 433–442, 1990. DOI: 10.1093/protein/3.5.433.
45. GERTSCH, Willies J. THE SPIDER GENUS LOXOSCELES IN SOUTH AMERICA (ARANEAE, SCYTODIDAE). **BULLETIN OF THE AMERICAN MUSEUM OF NATURAL HISTORY**, [S. l.], v. 136, n. 2830, p. 141–142, 1967. DOI: 10.1038/113141b0.
46. GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. **Life Sciences**, [S. l.], v. 80, n. 21, p. 1921–1943, 2007. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.037.
47. GIRISH, K. S.; SHASHIDHARAMURTHY, R.; NAGARAJU, S.; GOWDA, T. V.; KEMPARAJU, K. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (Naja naja) venom. **Biochimie**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 193–202, 2004. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.02.004.
48. GOBRON, Stéphane; MONNERIE, Hubert; MEINIEL, Robert; CREVEAUX, Isabelle; LEHMANN, Werner; LAMALLE, David; DASTUGUE, Bernard; MEINIEL, Annie. SCO-spondin: A new member of the thrombospondin family secreted by the subcommissural organ is a candidate in the modulation of neuronal aggregation. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 109, n. 5, p. 1053–1061, 1996. DOI: 10.1242/jcs.109.5.1053.
49. GOWDA, D. Channe; DAVIDSON, Eugene A. Structural features of carbohydrate moieties in snake venom glycoproteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 182, n. 1, p. 294–301, 1992. DOI: 10.1016/S0006-291X(05)80144-5.
50. GREMSKI, Luiza Helena et al. A novel expression profile of the Loxosceles intermedia spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 2403–2416, 2010. DOI: 10.1039/c004118a.
51. GREMSKI, Luiza Helena et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, [S. l.], v. 83, p. 91–120, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.02.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>.
52. GUILHERME, Patrícia; FERNANDES, Irene; BARBARO, Katia Cristina. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important Loxosceles spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, [S. l.], v. 39, n. 9, p. 1333–1342, 2001. DOI: 10.1016/S0041-0101(01)00085-X.
53. HART, Courtenay. Schulenberg Birte. Steinberg Thomas H. .. Leun. Wai-Yee. Patton Wayne F. Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels using Pro-Q emerald 300 dye, a fluorescent periodate schiff-base stain. **Electrophoresis**, [S. l.], v. 1853, p. 588–598, 2003.

- DOI: 10.1007/978-1-4939-8745-0_14.
54. HENNRICH, Marco Leo; GAVIN, Anne Claude. Quantitative mass spectrometry of posttranslational modifications: Keys to confidence. **Science Signaling**, [S. l.], v. 8, n. 371, p. 1–5, 2015. DOI: 10.1126/scisignal.aaa6466.
 55. HOGAN, Christopher J.; BARBARO, Katia Cristina; WINKEL, Ken. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, [S. l.], v. 44, n. 6, p. 608–624, 2004. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2004.08.028.
 56. HOSSAIN, Mahmud. Selected Reaction Monitoring mass Spectrometry (SRM-MS) in proteomics: A comprehensive view. **Springer International Publishing**, 2020.
 57. HUBICHE, Thomas; DELAUNAY, Pascal; DEL GIUDICE, Pascal. Images in clinical tropical medicine: A case of loxoscelism in southern France. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 807–808, 2013. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0339.
 58. ISBISTER, Geoffrey K.; FAN, Hui Wen. Spider bite. **The Lancet**, [S. l.], v. 378, n. 9808, p. 2039–2047, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62230-1.
 59. ISBISTER, Geoffrey K.; GRAUDINS, Andis; WHITE, Julian; WARRELL, David. Antivenom treatment in arachnidism. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 291–300, 2003. DOI: 10.1081/CLT-120021114.
 60. JORGE DA SILVA, Nelson; D. AIRD, Steven. **Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms**. [s.l.: s.n.]. v. 128 DOI: 10.1016/s1532-0456(00)00215-5.
 61. KALAPOTHAKIS, E. et al. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 50, n. 7, p. 938–946, 2007. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.07.001.
 62. KAWAHARA, Rebeca et al. **Community evaluation of glycoproteomics informatics solutions reveals high-performance search strategies for serum glycopeptide analysis**. [s.l.] : Springer US, 2021. v. 18 DOI: 10.1038/s41592-021-01309-x.
 63. KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: A therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 7–12, 2006. DOI: 10.1002/cbf.1261.
 64. KHOURY, George A.; BALIBAN, Richard C.; FLOUDAS, Christodoulos A. Proteome-wide post-translational modification statistics: Frequency analysis and curation of the swiss-prot database. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 1, p. 1–5, 2011. DOI: 10.1038/srep00090.
 65. KINI, R. Manjunatha. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, [S. l.], v. 34, n. 4–5, p. 200–204, 2006. DOI: 10.1159/000092424.
 66. KINI, R. Manjunatha; EVANS, Herbert J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, [S. l.], v. 28, n. 12, p. 1387–1422, 1990. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90155-Z.
 67. KOLARICH, Daniel; LÉONARD, Renaud; HEMMER, Wolfgang; ALTMANN, Friedrich. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespa vulgaris*. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 272, n. 20, p. 5182–5190, 2005. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04841.x.
 68. KREIL, Gunther. Hyaluronidases — a group of neglected enzymes. **Protein Science**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 1666–1669, 1995. DOI: 10.1002/pro.5560040902.
 69. KUHN-NENTWIG, Lucia; LANGENEGGER, Nicolas; HELLER, Manfred; KOUA, Dominique; NENTWIG, Wolfgang. The dual prey-inactivation strategy of spiders—in-depth venom analysis of *Cupiennius salei*. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 3, 2019. DOI: 10.3390/toxins11030167.
 70. LEAL, Hortênsia Gomes et al. Molecular cloning and functional characterization of recombinant Loxtox from *Loxosceles similis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 1112–1123, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.190. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.190>.
 71. LEE, Sangderk; LYNCH, Kevin R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 391, n. 2, p. 317–323, 2005. DOI: 10.1042/BJ20050043.
 72. LÉONARD, Renaud; RENDIĆ, Dubravko; RABOUILLE, Catherine; WILSON, Iain B. H.; PRÉAT, Thomas; ALTMANN, Friedrich. The *Drosophila* fused lobes gene encodes an N-acetylglucosaminidase involved in N-glycan processing. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 281, n. 8, p. 4867–4875, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M511023200.

73. LOPES, Priscila Hess; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, Carla Cristina; MARQUES, Mário Octávio Thá; TAMBOURGI, Denise V. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 94, n. 5, p. 1461–1477, 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02719-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02719-0>.
74. LOWE, John B.; MARTH, Jamey D. A genetic approach to mammalian glycan function. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 643–691, 2003. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161809.
75. MA, Junyan; LI, Qian; TAN, Haidong; JIANG, Hao; LI, Kuikui; ZHANG, Lihua; SHI, Quan; YIN, Heng. Unique N-glycosylation of a recombinant exo-inulinase from *Kluyveromyces cicerisporus* and its effect on enzymatic activity and thermostability. **Journal of Biological Engineering**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1186/s13036-019-0215-y.
76. MACHADO, Leandro F.; LAUGESEN, Sabrina; BOTELHO, Elvio D.; RICART, Carlos A. O.; FONTES, Wagner; BARBARO, Katia C.; ROEPSTORFF, Peter; VALLE DE SOUSA, Marcelo. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 2167–2176, 2005. DOI: 10.1002/pmic.200401096.
77. MALAQUE, Ceila M. S.; SANTORO, Marcelo L.; CARDOSO, João Luiz C.; CONDE, Mayra R.; NOVAES, Christina T. G.; RISK, José Y.; FRANÇA, Francisco O. S.; DE MEDEIROS, Carlos R.; FAN, Hui W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, [S. l.], v. 58, n. 8, p. 664–671, 2011. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.09.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.011>.
78. MÁLAQUE, Ceila Maria Sant Ana; CASTRO-VALENCIA, Jaime Enrique; CARDOSO, João Luiz Costa; FRANÇA, Francisco Oscar de Siqueira; BARBARO, Kátia Cristina; FAN, Hui Wen. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 139–143, 2002. DOI: 10.1590/S0036-46652002000300005.
79. MEDINA-SANTOS, Raíssa et al. Diversity of astacin-like metalloproteases identified by transcriptomic analysis in Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom and in vitro activity characterization. **Biochimie**, [S. l.], v. 167, p. 81–92, 2019. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.08.017.
80. MEDINA-SANTOS, Raíssa et al. Analysis of NGS data from Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom gland reveals toxin diversity. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, [S. l.], v. 43, n. March, 2022. DOI: 10.1016/j.cbd.2022.101017.
81. MELANI, Rafael D.; NOGUEIRA, Fabio C. S.; DOMONT, Gilberto B. It is time for top-down venomomics. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1186/s40409-017-0135-6.
82. MONSALVE, Rafael I.; GUTIÉRREZ, Ruth; HOOFF, Ilka; LOMBARDELO, Manuel. Purification and molecular characterization of phospholipase, antigen 5 and hyaluronidases from the venom of the Asian hornet (*Vespa velutina*). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0225672.
83. MORGON, Adriano M. et al. Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimie**, [S. l.], v. 128–129, p. 8–19, 2016. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.06.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.003>.
84. NAGARAJU, Shivaiah; DEVARAJA, Sannaningaiah; KEMPARAJU, Kempaiah. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. **Toxicon**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 383–393, 2007. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.04.007.
85. NAWARAK, Jiraporh; PHUTRAKUL, Suree; CHEN, Shui Tein. Analysis of lectin-bound glycoproteins in snake venom from the Elapidae and Viperidae families. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 383–392, 2004. DOI: 10.1021/pr034052+.
86. OLIVEIRA-MENDES, Bárbara Bruna Ribeiro De et al. From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: An overview focused on *Loxosceles similis*. **Toxicon**, [S. l.], v. 173, n. September 2019, p. 5–19, 2020. DOI:

- 10.1016/j.toxicon.2019.11.002.
87. OSIPOV, Alexey V.; ASTAPOVA, Maria V.; TSETLIN, Victor I.; UTKIN, Yuri N. The first representative of glycosylated three-fingered toxins: Cytotoxin from the *Naja kaouthia* cobra venom. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 271, n. 10, p. 2018–2027, 2004. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04115.x.
 88. OUYANG, Chaoho. 5' -NUCLEOTIDASE PURIFIED FROM TRIMERESURUS GRAMINEUS SNAKE VENOM in several animal species , including man , is generally accepted (BORN , 1962 ; MUSTARD platelets . Therefore , the ADP-removing system creatine phosphate (CP)/ creatine aggregation in. **Toxicon**, [S. l.], p. 491–501, 1983.
 89. PALMISANO, Giuseppe; LENDAL, Sara Eun; ENGHOLM-KELLER, Kasper; LETH-LARSEN, Rikke; PARKER, Benjamin L.; LARSEN, Martin R. Selective enrichment of sialic acid-containing glycopeptides using titanium dioxide chromatography with analysis by HILIC and mass spectrometry. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 1974–1982, 2010. DOI: 10.1038/nprot.2010.167. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.167>.
 90. PAULI, Isolete; MINOZZO, João Carlos; HENRIQUE DA SILVA, Paulo; CHAIM, Olga Meiri; VEIGA, Silvio Sanches. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 660–671, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.01.033.
 91. PETERSON, Michael E. Brown Spider Envenomation. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 191–193, 2006. DOI: 10.1053/j.ctsap.2006.10.004.
 92. PETRAS, Daniel; HEISS, Paul; SÜSSMUTH, Roderich D.; CALVETE, Juan J. Venom proteomics of indonesian king cobra, ophiophagus hannah: Integrating top-down and bottom-up approaches. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 2539–2556, 2015. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00305.
 93. PEZZI, Mario; GIGLIO, Anna Maria; SCOZZAFAVA, Annamaria; FILIPPELLI, Orazio; SERAFINO, Giuseppe; VERRE, Mario. Spider Bite: A Rare Case of Acute Necrotic Arachnidism with Rapid and Fatal Evolution. **Case Reports in Emergency Medicine**, [S. l.], v. 2016, p. 1–4, 2016. DOI: 10.1155/2016/7640789.
 94. PINEDA, Sandy S. et al. Structural venomomics reveals evolution of a complex venom by duplication and diversification of an ancient peptide-encoding gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 117, n. 21, 2020. DOI: 10.1073/pnas.1914536117.
 95. RAMAN, Rahul; RAGURAM, S.; VENKATARAMAN, Ganesh; PAULSON, James C.; SASISEKHARAN, Ram. Glycomics: An integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. **Nature Methods**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 817–824, 2005. DOI: 10.1038/nmeth807.
 96. RASH, Lachlan D.; HODGSON, Wayne C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 225–254, 2002. DOI: 10.1016/S0041-0101(01)00199-4.
 97. RIVERA, Io Guané; ORDOÑEZ, Marta; PRESA, Natalia; GOMEZ-LARRAURI, Ana; SIMÓN, Jorge; TRUEBA, Miguel; GOMEZ-MUÑOZ, Antonio. Sphingomyelinase d/ceramide 1-phosphate in cell survival and inflammation. **Toxins**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 1457–1466, 2015. DOI: 10.3390/toxins7051457.
 98. RUSSELL, Findlay E.; WALDRON, William G.; MADON, Mino B. Bites by the brown spiders *Loxosceles unicolor* and *Loxosceles arizonica* in California and Arizona. **Toxicon**, [S. l.], v. 7, n. 2, 1969. DOI: 10.1016/0041-0101(69)90073-7.
 99. SAGE, E. H.; BORNSTEIN, P. Extracellular, proteins that modulate cell-matrix interactions. Sparc, tenascin, and thrombospondin. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 266, n. 23, p. 14831–14834, 1991. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)98545-5.
 100. SAMS, Hunter H.; DUNNICK, Cory A.; SMITH, Michael L.; KING, Lloyd E. Necrotic arachnidism. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 561–576, 2001. DOI: 10.1067/mj.2001.112385.
 101. SARKAR, Mohan; LEVENTIS, Peter A.; SILVESCU, Cristina I.; REINHOLD, Vernon N.; SCHACHTER, Harry; BOULIANNE, Gabrielle L. Null mutations in *Drosophila* N-

- acetylglucosaminyltransferase I produce defects in locomotion and a reduced life span. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 281, n. 18, p. 12776–12785, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M512769200.
102. SAÚDE. Fundação Nacional da. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. [S.l.: s.n.], 2001. Disponível em: https://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/manu_peco01.pdf. Acesso em 05 de Dezembro de 2022.
 103. SAÚDE, Ministério da. SVS - **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. acesso em 18 nde Novembro de 2022.
 104. SAÚDE, ministério da. **Guia de vigilância em saúde**. 2 ed., Brasília: Ministério da saúde, 2017. Disponível em: https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/volume-unico-2017.pdf. Acesso em 02 de janeiro de 2023.
 105. SCHACHTER, Harry. Paucimannose N-glycans in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. **Carbohydrate Research**, [S. l.], v. 344, n. 12, p. 1391–1396, 2009. DOI: 10.1016/j.carres.2009.04.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.04.028>.
 106. SCHJOLDAGER, Katrine T.; NARIMATSU, Yoshiki; JOSHI, Hiren J.; CLAUSEN, Henrik. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 729–749, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-00294-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-00294-x>.
 107. SHAJAHAN, Asif; HEISS, Christian; ISHIHARA, Mayumi; AZADI, Parastoo. Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 409, n. 19, p. 4483–4505, 2017. DOI: 10.1007/s00216-017-0406-7.
 108. SILVA, BRUNO CÉSAR SOUZA. **Caracterização de Modificações Pós-Traducionais dos Venenos de Três Espécies de Aranhas do Gênero *Loxosceles* de Maior Importância Médica no Brasil**. 2020. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2020.
 109. SILVA, SABRINA KARIM. **Universidade Federal Do Paraná Loxoscelismo : Avanços E Desafios No Desenho De Fragmentos De Anticorpos Com Potencial Terapêutico Loxoscelismo : Avanços E Desafios No Desenho De Fragmentos De**. 2019. Universidade Federal do Paraná, [S. l.], 2019.
 110. SILVESTRE, F. G. et al. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). **Toxicon**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 927–936, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.09.002.
 111. SOARES, Sandro; OLIVEIRA, Leandro. Venom-Sweet-Venom: N-Linked Glycosylation in Snake Venom Toxins. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 913–919, 2009. DOI: 10.2174/092986609788923293.
 112. SPIRO, Robert G. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2002. DOI: 10.1093/glycob/12.4.43R.
 113. STANLEY, Pamela. What Have We Learned from Glycosyltransferase Knockouts in Mice? **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 428, n. 16, p. 3166–3182, 2016. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.03.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.025>.
 114. STRAUCH, Marcelo Abrahão; TOMAZ, Marcelo Amorim; MONTEIRO-MACHADO, Marcos; RICARDO, Hilmar Dias; CONS, Bruno Lemos; FERNANDES, Fabrício F. A.; EL-KIK, Camila Z.; AZEVEDO, Mariângela Soares; A. MELO, Paulo. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 145, n. 1, p. 50–58, 2013. DOI: 10.1016/j.jep.2012.10.033.
 115. SWANSON, David L.; VETTER, Richard S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 213–221, 2006. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2005.11.006.
 116. TAMBOURGI, Denise V.; MAGNOLI, Fábio C.; VAN DEN BERG, Carmen W.;

- MORGAN, B. Paul; DE ARAUJO, Pedro S.; ALVES, Elias W.; DA SILVA, W. Dias. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 251, n. 1, p. 366–373, 1998. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9474.
117. TAMBOURGI, Denise V.; PEDROSA, Matheus De F. Fernande.; VAN DEN BERG, Carmen W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, Rute M.; FERRACINI, Matheus; PAIXÃO-CAVALCANTE, Danielle; MORGAN, B. Paul; RUSHMERE, Neil K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 831–840, 2004. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.03.027.
118. TAN, Nget Hong; PONNUDURAI, Gnanajothy; CHUNG, Maxey C. M. Proteolytic specificity of rhodostoxin, the major hemorrhagin of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 979–984, 1997. DOI: 10.1016/S0041-0101(96)00186-9.
119. TAYLOR, ME. DRICKAMER, K. (2011) **Introduction to glycobiology**. Oxford university press [s.l: s.n.].
120. THAYSEN-ANDERSEN, Morten; PACKER, Nicolle H.; SCHULZ, Benjamin L. Maturing glycoproteomics technologies provide unique structural insights into the N-glycoproteome and its regulation in health and disease. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 1773–1790, 2016. DOI: 10.1074/mcp.O115.057638.
121. TREVISAN-SILVA, Dilza et al. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 21–32, 2010. DOI: 10.1016/j.biochi.2009.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.10.003>.
122. TREVISAN-SILVA, Dilza et al. A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom. **Scientific Data**, [S. l.], v. 4, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1038/sdata.2017.90.
123. TREVISAN-SILVA, Dilza; BEDNASKI, Aline Viana; GREMSKI, Luiza Helena; CHAIM, Olga Meiri; VEIGA, Silvio Sanches; SENFF-RIBEIRO, Andrea. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**, [S. l.], v. 76, p. 11–22, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.08.065. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.065>.
124. VALDEZ-CRUZ, Norma A.; BATISTA, Cesar V. F.; POSSANI, Lourival D. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 271, n. 8, p. 1453–1464, 2004. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04047.x.
125. VARKI, Ajit; RESEARCH, Glycobiology; CENTER, Training. Biological Roles of Glycans Glycobiology Advance Access Downloaded from. **Glycobiology**, [S. l.], n. 858, p. 3–49, 2016. Disponível em: <http://glycob.oxfordjournals.org/>.
126. VEIGA, Silvio S.; DA SILVEIRA, Rafael B.; DREYFUSS, Juliana L.; HAOACH, Juliana; PEREIRA, Aline M.; MANGILI, Oldemir C.; GREMSKI, Waldemiro. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 825–839, 2000. DOI: 10.1016/S0041-0101(99)00197-X.
127. VEIGA, Silvio S.; GREMSKI, Waldemiro; DOS SANTOS, Vera Lúcia P.; FEITOSA, Loara; MANGILI, Oldemir C.; NADER, Helena B.; DIETRICH, Carl P.; BRENTANI, Ricardo R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: Dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 587–607, 1999. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00198-6.
128. VERANO-BRAGA, Thiago; DUTRA, Alexandre A. A.; LEÓN, Ileana R.; MELO-BRAGA, Marcella N.; ROEPSTORFF, Peter; PIMENTA, Adriano M. C.; KJELDSEN, Frank. Moving pieces in a venomous puzzle: Unveiling post-translationally modified toxins from *Tityus serrulatus*. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 3460–3470, 2013. DOI: 10.1021/pr4003068.

129. WALSH, Christopher T.; GARNEAU-TSODIKOVA, Sylvie; GATTO, Gregory J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. **Angewandte Chemie - International Edition**, [S. l.], v. 44, n. 45, p. 7342–7372, 2005. DOI: 10.1002/anie.200501023.
130. WALSKI, Tomasz; DE SCHUTTER, Kristof; VAN DAMME, Els J. M.; SMAGGHE, Guy. Diversity and functions of protein glycosylation in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 83, p. 21–34, 2017. DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.02.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.02.005>.
131. WORLD SPIDER CATALOG. **World Spider Catalog. Online At [Http://Wsc.Nmbe.Ch](http://Wsc.Nmbe.Ch), Version 16.5, Accessed on**, 2022. DOI: 11 June 2015.
132. WRIGHT, R. P.; ELGERT, K. D.; CAMPBELL, B. J.; BARRETT, J. T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 159, n. 1, p. 415–426, 1973. DOI: 10.1016/0003-9861(73)90469-4.
133. YAMASHIRO, E. T., OLIVEIRA, A. K., KITANO, E. S., et al. "Proteoforms of the platelet-aggregating enzyme PA-BJ, a serine proteinase from *Bothrops jararaca* venom", **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2068–2076, 2014. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.09.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.09.012>.
134. ZAMANI, Alireza; RAFINEJAD, Javad. First record of the mediterranean recluse spider *Loxosceles rufescens* (Araneae: Sicariidae) from Iran. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 228–231, 2014.
135. ZHU, Qi; LIANG, Songping; MARTIN, Loïc; GASPARINI, Sylvaine; MÉNEZ, André; VITA, Claudio. Role of disulfide bonds in folding and activity of leiuorotoxin I: Just two disulfides suffice. **Biochemistry**, [S. l.], v. 41, n. 38, p. 11488–11494, 2002. DOI: 10.1021/bi026136m.