

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

Rafaela Silva Magalhães

**CARACTERIZAÇÃO FISIOPATOLÓGICA DO ENVENENAMENTO PELAS
ARANHAS-MARRONS *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata***

Belo Horizonte
2024

Rafaela Silva Magalhães

**CARACTERIZAÇÃO FISIOPATOLÓGICA DO ENVENENAMENTO PELAS
ARANHAS-MARRONS *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Dra. Clara Guerra Duarte

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Delfin
Chávez Olórtégui

Belo Horizonte

2024

043

Magalhães, Rafaela Silva.

Caracterização fisiopatológica do envenenamento pelas aranhas-marrons *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff.variegata* [manuscrito] / Rafaela Silva Magalhães. – 2024.

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

Orientador: Dra. Clara Guerra Duarte. Coorientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtgui.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Aranha Marrom Reclusa. 3. Venenos de Aranha. I. Duarte, Clara Guerra. II. Olórtgui, Carlos Delfin Chávez. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RAFAELA SILVA MAGALHÃES. Aos vinte e seis dias do mês de novembro de 2024 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line”, utilizando a plataforma “Zoom”, 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 fisiopatológica do envenenamento pelas aranhas marrom *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*”, 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. Clara Guerra Duarte, 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: Dra. Luiza Helena Gremski (Universidade Federal do Paraná), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Clara Guerra Duarte - Orientadora (FUNED), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

(x) 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, 26 de novembro de 2024.



Documento assinado digitalmente

LUIZA HELENA GREMSKI

Data: 02/12/2024 16:09:21-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Luiza Helena Gremski (UFPR)



Documento assinado digitalmente

LIZA FIGUEIREDO FELICORI VILELA

Data: 02/12/2024 15:49:23-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)



Documento assinado digitalmente

CARLOS DELFIN CHAVEZ OLORTEGUI

Data: 02/12/2024 14:40:59-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui - Coorientador (UFMG)



Documento assinado digitalmente

CLARA GUERRA DUARTE

Data: 02/12/2024 13:01:42-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Clara Guerra Duarte - Orientadora (FUNED)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido força e sabedoria no desenvolvimento deste trabalho e em toda a minha vida. Sou grata pela coragem que me deu para enfrentar os diversos obstáculos ao longo desta longa jornada do mestrado, que teve muitas subidas, descidas e curvas.

Aos meus pais, Celene e Sandro, e minhas irmãs, Amanda e Eduarda, pelo exemplo, apoio e carinho. Obrigada por todo incentivo, por me entenderem e estar ao meu lado sempre que precisei. Ao meu namorado Vinícius, minha melhor surpresa, por sempre ter me apoiado, incentivado e me abraçado quando precisei.

À minha orientadora, Clara Guerra Duarte, agradeço por todas as oportunidades de aprendizado, por me apoiar nos momentos de incerteza e pela compreensão nos momentos difíceis. Obrigada pela disposição em ensinar, por compartilhar seu conhecimento e estimular o meu. Obrigada por toda a orientação, ensinamento e cuidado.

A toda a equipe do Serviço de Toxinologia Molecular e do Serviço de Bioquímica de Venenos Animais da Fundação Ezequiel Dias, pela colaboração, companheirismo e conhecimentos partilhados.

A Labtest pela parceria para a realização dos exames bioquímicos.

Ao Prof. Carlos Chavez Olórtegui por me ter aberto as portas da Pós Graduação, ter me recebido e ter me auxiliado no início do mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG, e os Serviços da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da FUNED pelo conhecimento compartilhado e contribuições em meu processo de aprendizagem, especialmente a Flávia Cappuccio pela ajuda com a parte de histologia renal.

Aos meus familiares e amigos, por toda compreensão, incentivo e apoio.

As agências de fomento, FAPEMIG e CNPQ pelo fomento ao trabalho.

RESUMO

A aranha marrom, do gênero *Loxosceles*, é um aracnídeo de importância médica no Brasil, pois sua picada pode causar loxoscelismo, que pode ser cutâneo, resultando em lesões na pele, ou sistêmico, com sintomas graves. A maioria dos casos é cutânea e menos grave, mas a subnotificação de casos, faz com que a verdadeira prevalência do loxoscelismo seja subestimada. Este estudo caracterizou os efeitos fisiopatológicos, sistêmicos e imunológicos do veneno de *Loxosceles amazonica* (LaV) e *Loxosceles aff. variegata* (LvV), espécies cujos efeitos fisiopatológicos ainda não foram completamente descritos, em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro*, LaV demonstrou capacidade de agregação plaquetária, enquanto LvV inibiu a agregação de plaquetas lavadas. Ambos os venenos causaram hemólise direta de eritrócitos humanos, com influência dos sistemas ABO e Rh na atividade hemolítica. Os componentes dos venenos degradaram o fibrinogênio, sugerindo alterações na coagulação. Nos ensaios *in vivo*, seis coelhos fêmeas foram utilizados para ensaios de dermonecrose e avaliação de marcadores bioquímicos, e camundongos para determinar a DL50 dos venenos e para ensaio de avaliação renal. A DL50 foi de 1,72 mg/kg para LvV e 1,81 mg/kg para LaV, indicando toxicidade semelhante à da *Loxosceles laeta*. Os coelhos apresentaram sintomas de loxoscelismo viscero-cutâneo, com lesões dermonecróticas, alterações hematológicas e bioquímicas séricas. As análises histopatológicas dos camundongos envenenados confirmaram as lesões observadas nas urinálise e SDS-PAGE, refletindo a proteinúria significativa e danos renais. Conclui-se que os venenos de LaV e LvV causam um quadro clínico semelhante ao de outras espécies de *Loxosceles*. O estudo contribui para o entendimento da fisiopatologia do envenenamento por essas espécies, destacando a relevância clínica dos acidentes na área de ocorrência dessas aranhas.

Palavras-chaves: *Loxosceles*, dermonecrose, loxoscelismo sistêmico, Histopatologia.

ABSTRACT

The brown spider, of the genus *Loxosceles*, is an arachnid of medical importance in Brazil, as its bite can cause loxoscelism, which can be cutaneous, resulting in skin lesions, or systemic, with severe symptoms. Most cases are cutaneous and less severe, but the underreporting of cases means that the true prevalence of loxoscelism is underestimated. This study characterized the pathophysiological, systemic, and immunological effects of the venom of *Loxosceles amazonica* (LaV) and *Loxosceles aff. variegata* (LvV), species whose pathophysiological effects have not been completely described, *in vitro* and *in vivo* assays. *In vitro* assays, LaV demonstrated platelet aggregation capacity, while LvV inhibited washed platelet aggregation. Both venoms caused direct hemolysis of human erythrocytes, with the ABO and Rh systems influencing hemolytic activity. The venom components degraded fibrinogen, suggesting alterations in coagulation. *In vivo* assays, six female rabbits were used for dermonecrosis assays and biochemical marker evaluation, and mice to determine the DL50 of the venoms and for renal evaluation assays. The DL50 was 1.72 mg/kg for LvV and 1.81 mg/kg for LaV, indicating toxicity similar to that of *L. laeta*. The rabbits exhibited symptoms of viscerocutaneous loxoscelism, with dermonecrotic lesions, hematological alterations, and serum biochemical changes. Histopathological analyses of envenomed mice confirmed the lesions observed in urinalysis and SDS-PAGE, reflecting significant proteinuria and renal damage. It is concluded that LaV and LvV venoms cause a clinical picture similar to that of other *Loxosceles* species. The study contributes to the understanding of the pathophysiology of envenomation by these species, highlighting the clinical relevance of accidents in the areas where these spiders are found.

Keywords: *Loxosceles*, dermonecrosis, systemic loxoscelism, Histopathology.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD: Ácido-Citrato-Dextrose
ALT: Alanina Aminotransferase
AST: Aspartato Aminotransferase
BSA: Albumina Sérica Bovina
C1: Camundongo 1
C1LaV: Coelho 1 do Grupo de *Loxosceles amazonica*
C1LvV: Coelho 1 do Grupo de *Loxosceles aff. variegata*
C2: Camundongo 2
C2LaV: Coelho 2 do Grupo de *Loxosceles amazonica*
C2LvV: Coelho 2 do Grupo de *Loxosceles aff. variegata*
C3: Camundongo 3
C3LaV: Coelho 3 do Grupo de *Loxosceles amazonica*
C3LvV: Coelho 3 do Grupo de *Loxosceles aff. variegata*
C4: Camundongo 4
C5: Camundongo 5
C-: Controle Negativo
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK NAC: Creatinaquinase
CK-MB: Creatinaquinase Fração MB
CPPI: Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos
cDNA de PLDs: DNA Complementar de Fosfolipases D
DL50: Dose Média Letal
EDTA: Ácido Etilenodiaminetetraacético
FUNED: Fundação Ezequiel Dias
GGT: Gama-Glutamiltransferase
HCM: Hemoglobina Corpuscular Média
ICK: *Inhibitor Cystine Knots*
IL-6: Interleucina-6
IL-8: Interleucina-8
LALPs: *Loxosceles Astacin-Like Proteases*
LaV: Veneno de *Loxosceles amazonica*

LvV: Veneno de *Loxosceles aff. variegata*

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato

PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PRP: Plasma Rico em Plaquetas

P.M: Peso Molecular

Ref. Max: Referência Máxima

Ref. Min: Referência Mínima

RDW-SD: Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos Medido como Desvio Padrão

Rh: Fator Rhesus

SALox/SAAr IV: Soro Antiloxoscélico OU Soro Antiaracnídico, Intravenoso

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SISGEN: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

T0: Tempo Zero

TCTP: Proteína Tumoral Translacionalmente Controlada

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

α LiD1r: Soro de Cavalo Desenvolvido Contra a Toxina Dermonecrótica Recombinante de *Loxosceles intermedia*

α , β , γ : Alfa, Beta e Gama

g: Grama

kg: Quilograma

kDa: Kilodalton

n: Número

μ g: Micrograma

μ L: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aranhas do gênero *Loxosceles* adultas. *Loxosceles gaucho* fêmea (A) e macho (E); *Loxosceles intermedia* fêmea (B) e macho (F); *Loxosceles laeta* fêmea (C) e macho (G). Uma aranha castanha adulta e uma ooteca (seta) (D). O padrão clássico de violino (seta) aparece na superfície dorsal do cefalotórax de *Loxosceles gaucho* aranha adulta (H). Fonte: Gremski et al., 2014

Figura 2: Progressão do loxoscelismo cutâneo em paciente brasileiro. A) 1º dia; B) 9º dia; C) 16º dia e D) 25º dia. Fonte: Isbister & Fan (2011).

Figura 3: Acidentes notificados por *Loxosceles* sp. no Brasil de 2007 a 2022*. A) Número de acidentes notificados causados por aranhas do gênero *Loxosceles* entre os anos de 2007 e 2022 por região do Brasil. B) Variação da incidência de acidentes com *Loxosceles* em dez anos (2012-2022) por região. A média para o Brasil é demonstrada pela linha pontilhada. (C) Mapa do Brasil ilustrando a prevalência de acidentes Loxoscélicos por unidade federativa no ano de 2022. As intensidades das cores correspondem às taxas de incidência, conforme a legenda. Os gráficos foram produzidos utilizando o software GraphPad Prism 9.0, e a figura do mapa foi produzida utilizando o software QGIS. Os números dos acidentes foram recuperados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação -SINAN. *Dados sujeitos à revisão do SINAN, 2020-2022. Os dados da região Sudeste não incluem os dados do estado do Espírito Santo, pois o estado deixou de fornecer dados ao SINAN desde 2020. Fonte: Silva-Magalhães et al., 2024

Figura 4: Quelícera e glândula anexa de *Loxosceles similis*

Figura 5: Abundância de transcrições expressas capazes de codificar toxinas, representadas por seus valores em TPM (%). Fonte: Adaptado de Theodoro et al., (2024).

Figura 6: Classificação dos acidentes quanto à gravidade, manifestações clínicas e tratamento geral e específico no loxoscelismo. Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde, Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (2001) e Ofício Circular Nº 2 2014-CGDT/DEVIT/SVS/MS. SALox/SAAr IV: soro antiloxoscélico ou soro antiaracnídico, intravenoso.

Figura 7: Espécimes de *Loxosceles amazonica*. Fêmea (a) e macho (b) adultos coletados em Serra Branca, Paraíba. Fonte: Adriano L. Silveira

Figura 8: Espécimes de *Loxosceles aff. variegata*. Fêmea (a) e macho (b) adultos coletados em Ituiutaba, Minas Gerais. Fonte: Adriano L. Silveira

Figura 9: Efeito do veneno bruto de *Loxosceles amazonica* na agregação plaquetária. Agregação plaquetária com *Loxosceles amazonica* usando como C+ o colágeno. Plaquetas lavadas foram incubadas com 25µg e 50µg de veneno de *L. amazonica*. A agregação foi monitorada medindo a transmitância da luz por 10 minutos por um agregômetro. Média ± desvio padrão são mostrados.

Figura 10: Efeito do veneno bruto de *Loxosceles aff. variegata* nos agonistas colágeno (A) e convulxina (B) em relação ao seu potencial para inibir a agregação de plaquetas lavadas. Suspensão de plaquetas humanas lavadas foram pré-incubados com diferentes concentrações do veneno bruto de *L. aff. variegata* (25 e 50µg) sob agitação 600rpm a 37 °C. Após 3 min de incubação, os agonistas foram adicionados as Plaquetas lavadas sob agitação a 600 rpm a 37°C. A agregação foi monitorada medindo a transmitância da luz por 7 minutos por um agregômetro. Média ± desvio padrão são mostrados.

Figura 11: Ensaio hemolítico *in vitro*. Hemácias lavadas foram incubados com os venenos de *Loxosceles amazonica*, *L. aff. Variegata* e *L. gaucho* por 20h sob agitação suave. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram lidos a 550nm. (A) Percentual de hemólise considerando o Triton X-100 (controle positivo) como 100%. (B) Solução de Ringer Lactato, hemácias, venenos e controles após incubação e centrifugação. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 **** p < 0.0001.

Figura 12: Influência dos Sistemas ABO e Rh na atividade hemolítica direta de venenos loxoscélicos. Os tipos sanguíneos foram incubados com 12,5 µg de diferentes venenos de *Loxosceles* por 20 horas. A) Influência dos sistemas ABO e Rh na atividade hemolítica direta. B) Média das porcentagens de hemólise por tipo sanguíneo e por espécie na atividade hemolítica direta. C) Média das porcentagens de hemólise por tipo de fator Rh e por espécie na atividade hemolítica direta. Média ± desvio padrão expressos em porcentagem são mostrados. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, **** p < 0.0001. LaV - veneno de *Loxosceles amazonica*. LgV - veneno de *Loxosceles gaucho*. LvV - veneno de *Loxosceles aff. variegata*.

Figura 13: Zimograma da atividade fibrinogenolítica dos venenos loxoscélicos (A) e inibição da atividade através do uso dos inibidores (B) EDTA, (C) Fenantrolina e (D) PMSF. Setas em amarelo apontam para regiões claras que representam onde há presença de degradação enzimática pelos venenos.

Figura 14: Atividade fibrinogenolítica de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. A atividade proteolítica foi determinada por um ensaio de digestão de fibrinogênio (Fg) descrito por Medina-Santos *et al.*, 2019. A atividade fibrinogenolítica foi realizada utilizando 3 µg de veneno de *L. amazonica* (LaV) e *L. aff. Variegata* (LvV), incubado com fibrinogênio bovino por 16h a 37°C. Após a desnaturalização das amostras de fibrinogênio, puro ou pré-incubado com os venenos, foram analisadas por 12% SDS-PAGE. (A) À esquerda, o gráfico mostra a porcentagem de degradação das cadeias de fibrinogênio. À direita, o SDS-PAGE 12% mostra a atividade fibrinogenolítica do veneno de *L. amazonica* macho e fêmea. (B) À esquerda, o gráfico mostra a porcentagem de degradação das cadeias de fibrinogênio. À direita, o SDS-PAGE a 12% exibe a atividade fibrinogenolítica do veneno de *L. aff. variegata* macho e fêmea. O gráfico foi plotado com a média e desvio padrão do percentual de densidade das bandas em comparação ao controle de fibrinogênio, considerado como 100%, analisado no ImageJ.

Figura 15: Evolução da lesão dermonecrótica em coelhas inoculadas com 10 µg/kg de veneno de *Loxosceles amazonica* (A) e *Loxosceles aff. variegata* (B) ao longo de 0 a 504 horas, com as áreas da lesão (em cm²) representadas nos retângulos rosas. O pico da lesão, observado em 48 horas, está destacado com uma borda vermelha.

Figura 16: Hemograma dos animais envenenados. Valores ± desvio padrão da contagem de hemácias totais (A), hemoglobina (B) e hematócrito (C) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Hemácias totais: 5,0– 7,6 x 10⁶/µL; Hemoglobina: 5,2 – 13,5 g/dL; Hematócrito: 31,0 – 46,0 %. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, **** p < 0.0001. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referência máxima. Ref. mini – Referência mínima.

Figura 17: Índices hematimétricos dos animais envenenados. Valores ± desvio padrão da contagem de Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B), Volume Corpuscular Médio (C) e RDW-SD (D) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média: 32,0 – 37,0 g/dL; Hemoglobina Corpuscular Média: 20,1 – 25,1 pg; Volume Corpuscular Médio: 56,8 – 66,5 fL, RDW-SD: 35,0 – 56,0 fL. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*.

C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referencia máxima. Ref. mini – Referencia mínima.

Figura 18: Leucograma dos animais envenenados. Valores $\pm$ desvio padrão da contagem de Leucócitos totais (A), Linfócitos absolutos (B), Granulócitos absolutos (C) e Monócitos absolutos (D) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Leucócitos totais: $5,2 - 13,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; Linfócitos absolutos: $3,2 - 9,00 \times 10^3/\mu\text{L}$; Granulócitos absolutos: $2 - 7,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; Monócitos absolutos: $0,1 - 0,6 \times 10^3/\mu\text{L}$. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referencia máxima. Ref. mini – Referencia mínima.

Figura 19: Plaquetograma dos animais envenenados. Valores $\pm$ desvio padrão da contagem de plaquetas (A), Volume plaquetário médio (B) e Plaquetócrito (C) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Plaquetas: $100 - 712 \times 10^3/\mu\text{L}$; Volume plaquetário médio: $10 - 18 \text{ fL}$; Plaquetócrito: $0,1 - 0,5\%$. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referencia máxima. Ref. mini – Referencia mínima.

Figura 20: Análise dos níveis séricos de IL-6 (A) IL-8 (B) e TNF- α (C) de coelhos injetados com veneno de *L. amazonica* e *L. aff. variegata*. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*.

Figura 21: SDS-PAGE e Western Blot das urinas dos camundongos dos grupos de *Loxosceles amazonica*, coletadas em 6h, 24h e 72h. BSA - albumina sérica bovina. T0 - Tempo zero. C1 - Camundongo 1 C2 - Camundongo 2. C3 - Camundongo 3. C4 - Camundongo 4. C5 -

Camundongo 5. C- - Controle negativo. P.M - Peso molecular. LaV: veneno de *Loxosceles amazonica*. α LiD1r - soro de cavalo desenvolvidos contra a toxina dermonecrótica recombinante de *Loxosceles intermedia*.

Figura 22: SDS-PAGE e Western Blot dos camundongos dos subgrupos de *Loxosceles aff. variegata*, coletadas 6h, 24h, 72h. BSA - albumina sérica bovina. T0 - Tempo zero. C1 - Camundongo 1. C2 - Camundongo 2. C3 - Camundongo 3. C4 - Camundongo 4. C5 - Camundongo 5. C- - Controle negativo. P.M - Peso molecular. LaV: veneno de *Loxosceles amazonica*. α LiD1r - soro de cavalo desenvolvidos contra a toxina dermonecrótica recombinante de *Loxosceles intermedia*.

Figura 23: Histologia renal de camundongos inoculados com $\frac{1}{2}$ DL₅₀ de veneno de *Loxosceles amazonica*, após coloração de azul de toluidina. (A) Túbulos e glomérulos renais íntegros. (B) Túbulos hipertróficos e deposição de proteína em túbulos. (C) Túbulos necróticos (setas) e cilindros hialinos (*). (D) Túbulos necróticos (setas). (E) . (F) Túbulos necróticos (setas) e glomérulo isquêmico.

Figura 24: Histologia renal de camundongos inoculados com $\frac{1}{2}$ DL₅₀ de veneno de *Loxosceles aff. variegata*, após coloração de azul de toluidina. (A) Túbulos e glomérulos renais íntegros. (B) Túbulos necróticos (setas). (C) Túbulos necróticos (setas). (D) Túbulos hipertróficos (*).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Levantamento de dados experimentais de dermonecrose induzida por venenos loxoscélicos.

Tabela 2: Valores de referências do hemograma e índices hematimétricos, leucograma e plaquetograma.

Tabela 3: Concentrações plasmáticas de (ALT), (AST) E (GGT) de coelhos, 0 horas a 336h após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. Variegata*. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, **** p < 0.0001.

Tabela 4: Concentrações plasmáticas de (CK NAC) e (CKMB) de coelhos, 0 horas a 336h após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. Variegata*. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, **** p < 0.0001.

Tabela 5: Concentrações plasmáticas de ureia e creatinina de coelhos, 0 horas a 336h após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. Variegata*. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, **** p < 0.0001.

Tabela 6: Concentrações de Dose Letal 50 (DL50) definidas para os venenos de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. Variegata*.

Tabela 7: Determinação semiquantitativa de proteína, sangue e leucócitos nas urinas de camundongos para avaliação de dano renal.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais achados dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* em diferentes abordagens.

SUMÁRIO

1. Introdução e revisão da literatura	18
1.1. Taxonomia e biologia das aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	18
1.2. Loxoscelismo cutâneo e sistêmico	19
1.3. Epidemiologia do envenenamento por <i>Loxosceles sp</i>	21
1.4. Componentes do veneno de <i>Loxosceles sp</i>	23
1.5. Patogenia e mecanismos de ação do veneno	26
1.6. Diagnóstico Laboratorial, Tratamento e Manejo Clínico	28
1.7. <i>Loxosceles amazonica</i> e <i>Loxosceles aff. variegata</i>	30
2. Objetivos	33
2.1. Geral.....	33
2.2. Específicos	33
3. Material e Métodos	34
3.1. Aranhas, venenos e antivenenos	34
3.2. Ensaio in vitro	34
3.2.1. Ensaio de agregação e inibição plaquetária	34
3.2.2. Atividade hemolítica	35
3.2.3. Atividade fibrinogenolítica	36
3.2.3.1. Zimograma.....	36
3.2.3.2. Ensaio de digestão de fibrinogênio	36
3.3. Ensaio in vivo	37
3.3.1. Modelo experimental de loxoscelismo cutâneo em coelhos.....	37
3.3.1.1. Animais e protocolo experimental de dermonecrose	37
3.3.1.2. Coleta e processamento das amostras de sangue	38
3.3.1.3. Hemograma	38
3.3.1.4. Perfil bioquímico	38
3.3.1.5. Perfil inflamatório	39
3.3.2. Modelo experimental de loxoscelismo sistêmico em camundongos	39
3.3.2.1. Animais e protocolo experimental de DL50.....	39
3.3.2.2. Coleta, eletroforese e análise das urinas	40
3.3.2.3. Avaliação histopatológica.....	40
3.4. Análise estatística.....	41

4. Resultados e Discussão	42
4.1. Ensaios <i>in vitro</i>	42
4.1.1. Ensaios de agregação e inibição plaquetária	42
4.1.2. Curva dose-resposta da atividade hemolítica direta dos venenos de <i>L. amazonica</i> e de <i>L. aff. variegata</i>	45
4.1.3. Avaliação da interferência dos sistemas ABO e Rh na hemólise direta	47
4.1.4. Atividade fibrinogenolítica	50
4.2. Ensaios <i>in vivo</i>	53
4.2.1. Dermonecrose	53
4.2.2. Hemograma	56
4.2.3. Leucograma	62
4.2.4. Plaquetograma	65
4.2.5. Perfil bioquímico e inflamatório	67
4.2.6. Dose Letal 50 (DL ₅₀)	74
4.2.7. Avaliação de danos renais	76
5. Conclusões	84
6. Referências Bibliográficas	86
7. Anexo	95
7.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	95
7.2. Autorização plataforma Brasil	96
7.3. Autorização Sisgen	101
7.4. Artigo publicado: <i>Loxosceles amazonica</i> Brown Spider venom: Insights into enzymatic activities, immunorecognition, and novel phospholipase D isoformas....	102

1. Introdução e revisão da literatura

1.1. Taxonomia e biologia das aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família *Sicariidae*, representada atualmente por 170 espécies amplamente distribuídas pelo mundo e encontradas em vários países da América do Sul (WORLD SPIDER CATALOG, 2024). Estas aranhas são animais pequenos que medem em torno de 4 cm de diâmetro quando adultos, possuem coloração marrom e apresentam dimorfismo sexual nas diferentes espécies, sendo que os machos possuem corpo menor e patas mais longas (Figura 1A, B e C) que as fêmeas (Figura 1E, F e G). O maior tamanho corporal das fêmeas é um possível motivo que explica porque elas conseguem injetar mais veneno (DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2014). Além disso, as *Loxosceles* possuem algumas características típicas que permitem a distinção do gênero, como o padrão clássico de violino que aparece na superfície dorsal do cefalotórax (Figura 1H), e os seis pares de olhos dispostos em pares, um par frontal e dois laterais (DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2020).



Figura 1: Aranhas do gênero *Loxosceles* adultas. *Loxosceles gaucho* fêmea (A) e macho (E); *Loxosceles intermedia* fêmea (B) e macho (F); *Loxosceles laeta* fêmea (C) e macho (G). Uma aranha castanha adulta e uma ooteca (seta) (D). O padrão clássico de violino (seta) aparece na superfície dorsal do cefalotórax de *Loxosceles gaucho* aranha adulta (H). Fonte: Gremski *et al.*, 2014

Essas aranhas possuem uma capacidade de sobreviver por longos períodos sem acesso à alimentação, podendo manter-se por meses sem se alimentar. Além disso, demonstram uma notável resistência ambiental, sendo capazes de suportar uma ampla variação de temperatura, desde 8°C até 43°C. São animais de hábitos noturnos e sedentários, que vivem em áreas escuras e constroem teias com tramas similares à fios de algodão (Figura 1D, seta). No ambiente domiciliar, geralmente se encontram em lugares mais reservados, escuros e pouco ventilados, como entre armários, gavetas e sapatos. Elas não são agressivas e os acidentes geralmente são desencadeados quando as aranhas são pressionadas contra o corpo ou quando se sentem ameaçadas e vulneráveis (DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2020)

1.2. *Loxoscelismo cutâneo e sistêmico*

O Loxoscelismo é grupo de sinais e sintomas observados após uma picada de aranha marrom, que se divide em loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico. Alguns fatores podem contribuir para a gravidade desses quadros, que inclui a quantidade de veneno injetado em cada indivíduo, a diferença de toxicidade existente entre os venenos das espécies, a presença de infecções secundárias e comorbidades, as características genéticas e fisiológicas do indivíduo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2022).

O acidente com *Loxosceles* são indolores e os pacientes muitas vezes não percebem a picada da aranha. Os primeiros sinais e sintomas aparecem cerca de 2 a 8 horas após a picada, levando a alterações cutâneas que podem ou não estar associadas a complicações sistêmicas (ISBISTER; FAN, 2011). A forma cutânea do loxoscelismo é mais frequente, ocorrendo em mais de 50% das vítimas, e sendo manifestada nas primeiras 48 horas. Essa forma é caracterizada inicialmente por uma dor ligeira local e eritema, que geralmente evolui para necrose e ulceração extensa da pele (Figura 2). Outros sinais e sintomas relacionados ao loxoscelismo cutâneo é a dor local, ardência e prurido. Algumas complicações já observadas são a perda tecidual, cicatrizes desfigurantes e infecções secundárias.

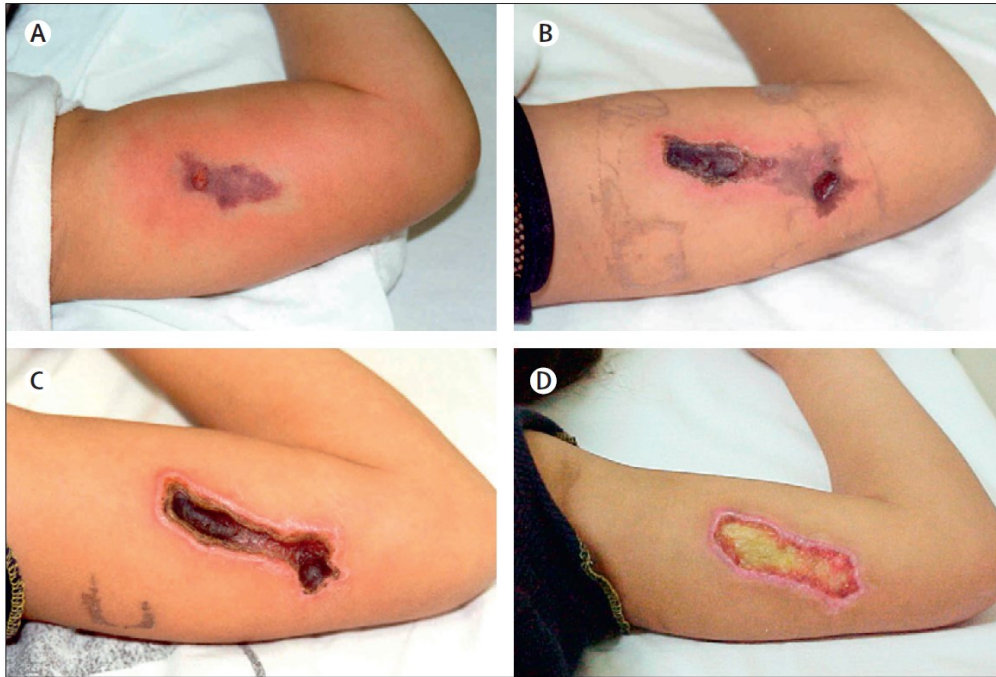


Figura 2: Progressão do loxoscelismo cutâneo em paciente brasileiro. A) 1º dia; B) 9º dia; C) 16º dia e D) 25º dia. Fonte: Isbister & Fan (2011).

A forma sistêmica é menos frequente, chegando até 10% dos casos, dependendo da região e da espécie de *Loxosceles* envolvida. Os sinais e sintomas incluem: febre, mal-estar, fraqueza, náuseas, vômitos, hematúria, icterícia, trombocitopenia, hemólise intravascular, coagulação intravascular disseminada e a lesão renal aguda (LRA), que é a principal causa de morte no loxoscelismo (LOPES et al., 2020; ALBUQUERQUE et al., 2018; MALAQUE et al., 2002). Em trabalhos experimentais com animais também já foram descritas associações do veneno com alterações no coração, cérebro e fígado (DE OLIVEIRA CHRISTOFF et al., 2008; DIAS-LOPES et al., 2010; PLENGE-TELLECHEA et al., 2019). E em estudos com humanos também já foi relatado complicações cardíacas, como miocardite (LANGNER et al., 2021) e o loxoscelismo se apresentando com padrão de infarto do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST no eletrocardiograma (NAVARRO-MARTINEZ et al., 2022).

1.3. Epidemiologia do envenenamento por *Loxosceles sp*

O loxoscelismo é um problema de saúde pública, mas sua prevalência ainda é desconhecida ou subestimada na maior parte dos estados brasileiros devido subnotificação dos casos e a baixa compreensão do modo e a intensidade de interação dessas aranhas com a população humana (ALMEIDA *et al.*, 2017). Os dados de acidentes com aranhas, e mais especificamente com aranhas do gênero *Loxosceles*, são compilados anualmente pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), ligado ao Ministério da Saúde.

Segundo os dados recuperados do SINAN, 2024 (Figura 3), percebe-se que o número de acidentes notificados causados por aranhas do gênero *Loxosceles* vem aumentando em todas as regiões do Brasil desde 2016, com exceção da região Sul, que vem seguindo uma tendência oposta (Figura 3A). Como visto no período de dez anos entre 2012 e 2022, a incidência de acidentes por *Loxosceles* teve um aumento considerável nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, porém um aumento relevante também é observado no Norte e no Sudeste, enquanto no Sul a incidência vem caindo (Figura 3B). É importante destacar que, como o número absoluto de casos notificados e a prevalência de loxoscelismo em todas as demais regiões brasileiras são menores do que na região Sul (Figura 3A), que tradicionalmente registra o maior número de casos, a média nacional de incidência de loxoscelismo tem diminuído. No entanto, diante desse cenário, é fundamental entender as causas associadas ao aumento dos acidentes por *Loxosceles* em algumas regiões do Brasil e investigar se espécies não comumente consideradas de interesse médico estão ligadas ao crescimento dos casos nessas áreas.

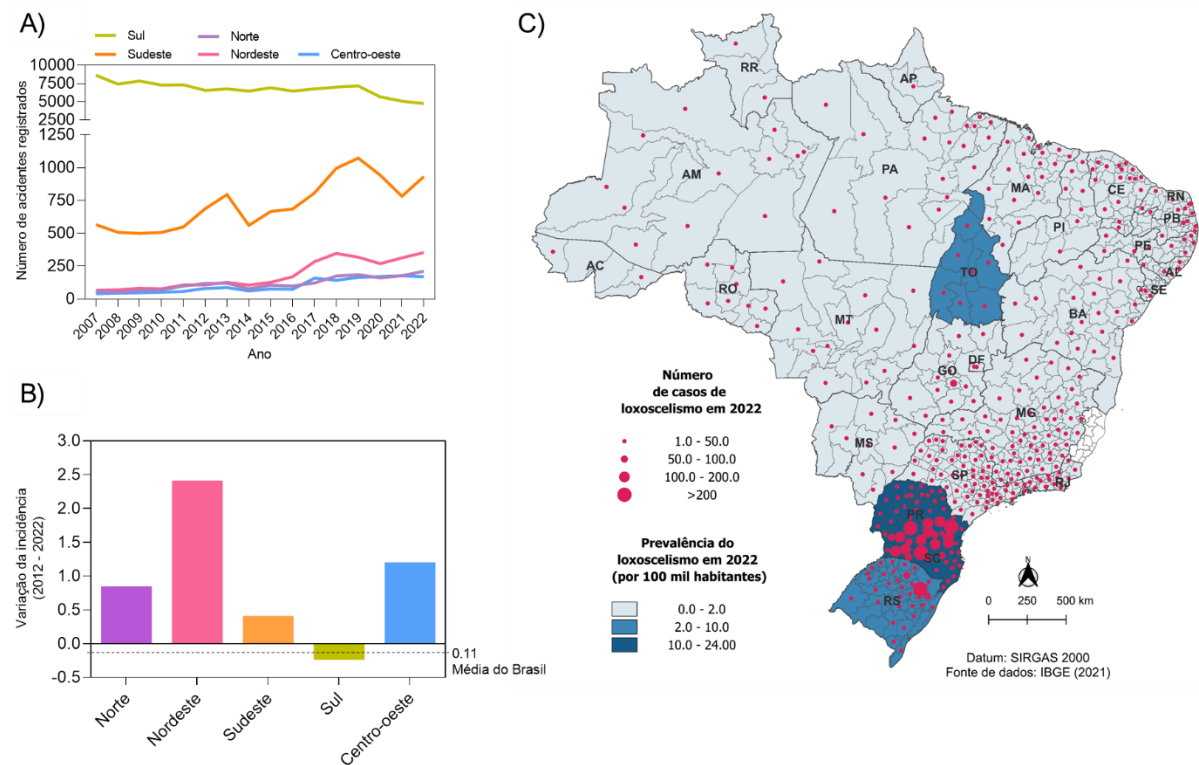


Figura 3: Acidentes notificados por *Loxosceles* sp. no Brasil de 2007 a 2022*. A) Número de acidentes notificados causados por aranhas do gênero *Loxosceles* entre os anos de 2007 e 2022 por região do Brasil. B) Variação da incidência de acidentes com *Loxosceles* em dez anos (2012-2022) por região. A média para o Brasil é demonstrada pela linha pontilhada. (C) Mapa do Brasil ilustrando a prevalência de acidentes Loxoscélicos por unidade federativa no ano de 2022. As intensidades das cores correspondem às taxas de incidência, conforme a legenda. Os gráficos foram produzidos utilizando o software GraphPad Prism 9.0, e a figura do mapa foi produzida utilizando o software QGIS. Os números dos acidentes foram recuperados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação -SINAN. *Dados sujeitos à revisão do SINAN, 2020-2022. Os dados da região Sudeste não incluem os dados do estado do Espírito Santo, pois o estado deixou de fornecer dados ao SINAN desde 2020. Fonte: Silva-Magalhães *et al.*, 2024

1.4. Componentes do veneno de *Loxosceles sp*

O veneno das aranhas-marrom é produzido em duas glândulas (Figura 4) localizadas na região do cefalotórax e elas o utilizam para ajudar na alimentação, paralisando suas presas (insetos, outros artrópodes e pequenos vertebrados) e também como mecanismo de defesa. (DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2005; GREMSKI *et al.*, 2014). O volume injetado durante uma picada é em torno de 4 μ L, com um conteúdo variando de 30 a 100 μ g de proteína, dependendo da espécie (FORRESTER *et al.*, 1978; SAMS *et al.*, 2001).



Figura 4: Quelícera e glândula anexa de *Loxosceles similis*

O veneno das aranhas-marrons contém diversas proteínas com atividades biológicas diferentes, sendo principalmente proteínas entre 5 a 40 kDa (SILVESTRE *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que grande parte dos componentes presentes nas glândulas de veneno ainda é pouco conhecida, sendo que 25% dos transcritos das glândulas de veneno de *L. laeta* e 47% dos transcritos das glândulas de veneno de *L. intermedia* ainda não possuem funções descritas (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2010), sendo um campo a ser mais estudado e explorado.

Uma análise atual do transcriptoma das espécies de importância médica no Brasil revelou que a maior proporção de transcritos classificados como toxinas foi observada no transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* (41,6%), seguido por *L. intermedia* (29,6%) e *L. gaucho* (15,5%) (Figura 5). As análises confirmam a

presença de um grupo bem estabelecido de toxinas altamente expressas, classificadas com base em seus valores de transcrições por milhão (TPM): Fosfolipases D, Metaloproteases e Peptídeos ICK (Inhibitor Cystine Knots). Além disso, um grupo de toxinas é expresso em proporções menores incluindo serino proteases, inibidores de serino protease, hialuronidasas, TCTP e neurotoxinas. Todas essas superfamílias de toxinas menos expressas representam menos de 1% do total de toxinas potenciais dentro de seus respectivos transcriptoma, exceto as serino proteases em *L. intermedia* (1,7%) (THEODORO *et al.*, 2024).

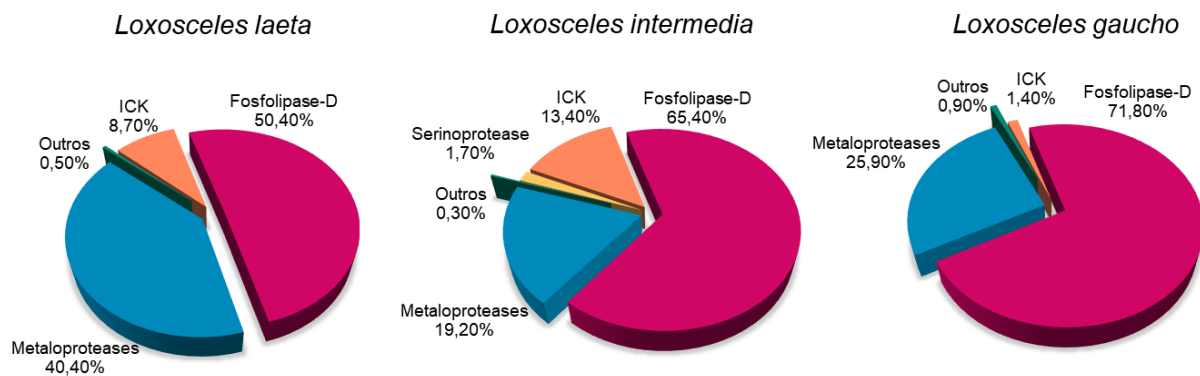


Figura 5: Abundância de transcrições expressas capazes de codificar toxinas, representadas por seus valores em TPM (%). Fonte: Adaptado de Theodoro *et al.*, (2024).

As Fosfolipases D (PLDs) apresentam massa molecular em torno de 35 kDa, são altamente expressas nos venenos loxoscélicos (65,4% em *L. intermedia*, 71,8% em *L. gaucho* e 50,4% em *L. laeta*) e são encontradas em diferentes isoformas (GREMSKI *et al.*, 2010; THEODORO *et al.*, 2024). As PLDs são as toxinas mais estudadas e caracterizadas dos venenos loxoscélicos, devido à sua importância no quadro clínico do envenenamento e por serem consideradas o principal componente tóxico do veneno (DA SILVA *et al.*, 2004). No entanto, tem sido sugerido que todas as manifestações clínicas do acidente loxoscélico são resultado da atividade sinérgica entre todos os componentes do veneno (CHAIM *et al.*, 2011a).

Outra classe de enzimas importantes no quadro de envenenamento são as proteases. As metaloproteases é a segunda toxina mais expressa (19,2% para *L.*

intermedia, 25,9% para *L. gaucho* e 40,4% para *L. laeta*) (THEODORO *et al.*, 2024). Essas moléculas, presentes nos venenos loxoscélicos, são homólogas às enzimas digestivas astacinas de lagostin *Astacus astacus* e por essa razão, são denominadas LALPs (*Loxosceles astacin-like proteinase*) e atuam principalmente nas estruturas da matriz extracelular (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). As serino proteases, apesarem que serem pouco expressas no veneno de *Loxosceles*, parecem estarem relacionadas à degradação de gelatina e estas possuem entre 85 a 95 kDa. Existem poucos estudos sobre essa proteína e por essa razão seu papel no envenenamento ainda não está determinado (GREMSKI *et al.*, 2021).

Outra proteína presente no veneno de *Loxosceles* com importante papel no quadro clínico do loxoscelismo são as hialuronidases que possuem aproximadamente 43 kDa. Mesmo presentes em pequenas quantidades no veneno, pertencem a uma classe de enzimas que degradam o ácido hialurônico, principal componente da matriz extracelular de vertebrados (BERTONI *et al.*, 2007).

A proteína tumoral controlada pela tradução (TCTP), com aproximadamente 22,3 kDa, é encontrada no veneno de *Loxosceles* e atua como um fator de liberação de histamina dos mastócitos, contribuindo para a resposta alérgica e inflamatória do loxoscelismo. Embora apresente um baixo nível de expressão no veneno de *Loxosceles*, a TCTP atua de forma sinérgica com as fosfolipases D na indução de edema após o envenenamento (GREMSKI *et al.*, 2021).

O peptídeos ICK são componentes caracterizados biologicamente são polipeptídeos com pesos moleculares que variam de 5,6 a 7,9 kDa, e apresentaram atividade inseticida contra pragas altamente destrutivas, como *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera cosmioides*. Análises de similaridade de sequência indicam que essas moléculas atuam em canais iônicos específicos, e elas compõem 13,4% das toxinas potencialmente expressas em *L. intermedia*, eles respondem por 8,7% em *L. laeta* e apenas 1,4% em *L. gaucho* (GREMSKI *et al.*, 2010; THEODORO *et al.*, 2024).

1.5. Patogenia e mecanismos de ação do veneno

Conforme descrito anteriormente, o veneno das aranhas *Loxosceles* possui uma composição diversa de diferentes classes de toxinas. Alguns componentes foram bem caracterizados bioquímica e biologicamente, fornecendo informações sobre os mecanismos pelos quais o veneno causa seus efeitos cutâneos e sistêmicos (CHATZAKI *et al.*, 2012; DANTAS *et al.*, 2014; HORTA *et al.*, 2013; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; SILVESTRE *et al.*, 2005). Esses efeitos são complexos e podem ser causados por um sinergismo da ação das diversas toxinas (GREMSKI *et al.*, 2014).

As atividades enzimáticas do veneno estão relacionadas e são importantes para hemorragia local, disseminação gravitacional das lesões cutâneas e complicações sistêmicas, como coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal. A hialuronidase é uma enzima capaz de facilitar a dispersão dos componentes tóxicos do veneno e a propagação gravitacional (OLIVEIRA-MENDES *et al.*, 2020; VEIGA *et al.*, 2001). A caracterização de uma isoforma recombinante de hialuronidase demonstrou que a pré-incubação dessa proteína com o veneno aumentou o efeito dermonecrótico em coelhos, corroborando seu papel sugerido como fator de espalhamento (DE-BONA *et al.*, 2021; FERRER *et al.*, 2013).

As proteases (metaloproteases e serino proteases) atuam em diferentes substratos e degradam proteoglicanos de fibrinogênio, fibronectina, entactina e sulfato de heparano, rompendo a membrana basal e as estruturas da matriz extracelular (OLIVEIRA-MENDES *et al.*, 2020; VEIGA *et al.*, 2001). No veneno loxoscélico, as principais metaloproteases são as LALPs (*Loxosceles astacin-like proteases*) (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). A degradação de moléculas da matriz extracelular e a ruptura das membranas basais podem estar relacionadas a atividades deletérias do veneno, como perda da integridade vascular e glomerular. Além disso, a metaloprotease está envolvida em hemorragias, produzindo filtração de leucócitos e servindo como via de disseminação do veneno para outros tecidos, e também está relacionada com a agregação plaquetária (FEITOSA *et al.*, 1998; PLENGETELLECHEA *et al.*, 2019; VEIGA *et al.*, 2001).

As fosfolipases D (PLDs) são os principais componentes tóxicos no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* e desempenham um papel crucial na patogenicidade do loxoscelismo. Essas enzimas catalisam a clivagem de fosfolipídios da membrana celular, especialmente a esfingomielina, resultando na produção de ceramida-1-fosfato e colina, que contribuem para a necrose cutânea e a resposta inflamatória intensa observada após a picada (BOIA-FERREIRA *et al.*, 2019; CHAIM *et al.*, 2011b; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019; FINGERMANN *et al.*, 2020; PLENGE-TELLECHEA *et al.*, 2019). Outros fosfolipídeos, como lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilserina e lisofosfatidilinositol, podem servir como substratos dessa enzima, que cliva essas moléculas entre as ligações fosfato e as porções hidrofílicas (TAMBOURGI *et al.*, 1998a). Essas toxinas são responsáveis por muitos dos efeitos locais e sistêmicos do envenenamento, incluindo dermonecrose e hemólise, decorrentes de produtos bioativos gerados pelo metabolismo dos fosfolipídeos de membrana após a atividade enzimática. Elas também causam uma resposta inflamatória massiva, insuficiência renal aguda (associada à hemólise) e trombocitopenia (FUTRELL, 1992; GREMSKI *et al.*, 2010, 2020).

Ao que se diz da reação inflamatória no loxoscelismo, há importantes mediadores que desempenham papel fundamental na quimiotaxia e na ativação de neutrófilos. Estudos identificaram que a ação das fosfolipases D no veneno das aranhas *Loxosceles* não só leva à necrose cutânea, mas também à liberação de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, que são essenciais para o recrutamento e a ativação de neutrófilos no local da picada (GREMSKI *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2005). Esses mediadores, incluindo a interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), amplificam a resposta inflamatória, agravando a lesão tecidual e contribuindo para a gravidade dos sintomas clínicos (BARBARO *et al.*, 2010; DRAGULEV *et al.*, 2007).

A compreensão detalhada desses mecanismos é crucial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes que possam mitigar a resposta inflamatória e prevenir as complicações associadas ao envenenamento por *Loxosceles*. Diversos estudos tentaram detalhar a base molecular da inflamação e demonstrar a relevância

da Fosfolipase D nos acidentes com aranhas *Loxosceles*. Contudo, os mecanismos inflamatórios e o sinergismo de diversas toxinas ainda permanecem em investigação.

1.6. Diagnóstico Laboratorial, Tratamento e Manejo Clínico

O diagnóstico laboratorial para acidentes com *Loxosceles* é basicamente clínico e focado na ferida cutânea, porém dependendo da forma desenvolvida do loxoscelismo, exames laboratoriais podem auxiliar na definição do diagnóstico e tratamento adequado (Ministério da Saúde, 2001; LOPES *et al.*, 2020).

O exame físico do paciente inclui a anamnese, medição da temperatura corporal, pressão arterial, saturação de oxigênio, pulso e frequência respiratória. No exame anatomopatológico observa-se intensa vasculite no local da picada, seguida de obstrução de pequenos vasos, infiltração de células polimorfonucleares e agregação plaquetária com o desencadeamento de edema, hemorragia e necrose focal. Na forma cutânea, é possível ver hemograma com leucocitose e neutrofilia, já na forma cutâneo-visceral, uma anemia aguda, plaquetopenia, reticulocitose, hiperbilirrubinemia indireta, queda dos níveis séricos de haptoglobina, elevação dos séricos de potássio, creatinina e uréia e coagulograma alterado (Ministério da Saúde, 2001).

O uso de ELISA pode ser útil para o diagnóstico de casos suposto e como uma ferramenta para confirmar casos prováveis, como já demonstrado para algumas espécies de *Loxosceles*, nos trabalhos de Chávez-Olórtegui *et al.*, (1998), GOMEZ *et al.*, (2002), STOECKER *et al.*, (2006). Em um estudo mais recente, foi desenvolvido um método rápido, simples e visual baseado na amplificação isoterma mediada por loop (LAMP) para detectar envenenamento experimental por *Loxosceles*. Este método mostrou alta sensibilidade, sendo capaz de detectar até 0,32 pg de DNA de *Loxosceles*, o que é 64 vezes mais sensível do que a PCR. O teste foi específico para *Loxosceles*, sem reação cruzada com outros agentes causadores de lesões dermonecrosantes. Além disso, permitiu a detecção de DNA de *Loxosceles intermedia* em amostras de cabelo, soro e exsudato de coelhos envenenados experimentalmente dentro de 72 horas (FERNANDES *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que os exames laboratoriais são essenciais para excluir outras doenças envolvidas no diagnóstico diferencial do loxoscelismo e confirmar o diagnóstico do loxoscelismo cutâneo-hemolítico, além de monitorar as condições sistêmicas menos graves que podem estar presentes no loxoscelismo cutâneo, para monitorar a lesão cutânea e os tecidos associados, e por fim direcionar o tratamento adequado dependendo de qual quadro do loxoscelismo o indivíduo manifeste (LOPES *et al.*, 2020).

A indicação do antiveneno para o tratamento do loxoscelismo é controversa na literatura, sendo que alguns acreditam que o antiveneno deve ser administrado nas primeiras 24h e outros quando houver indícios de loxoscelismo sistêmico (GENDRON, 1990; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). No Brasil, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde é a administração do soro antiloxoscélico ou soro antiaracnídico, porém a terapia com o antiveneno é recomendada somente em casos moderados e graves como mostrado na figura 6 (Ministério da Saúde, 2001).

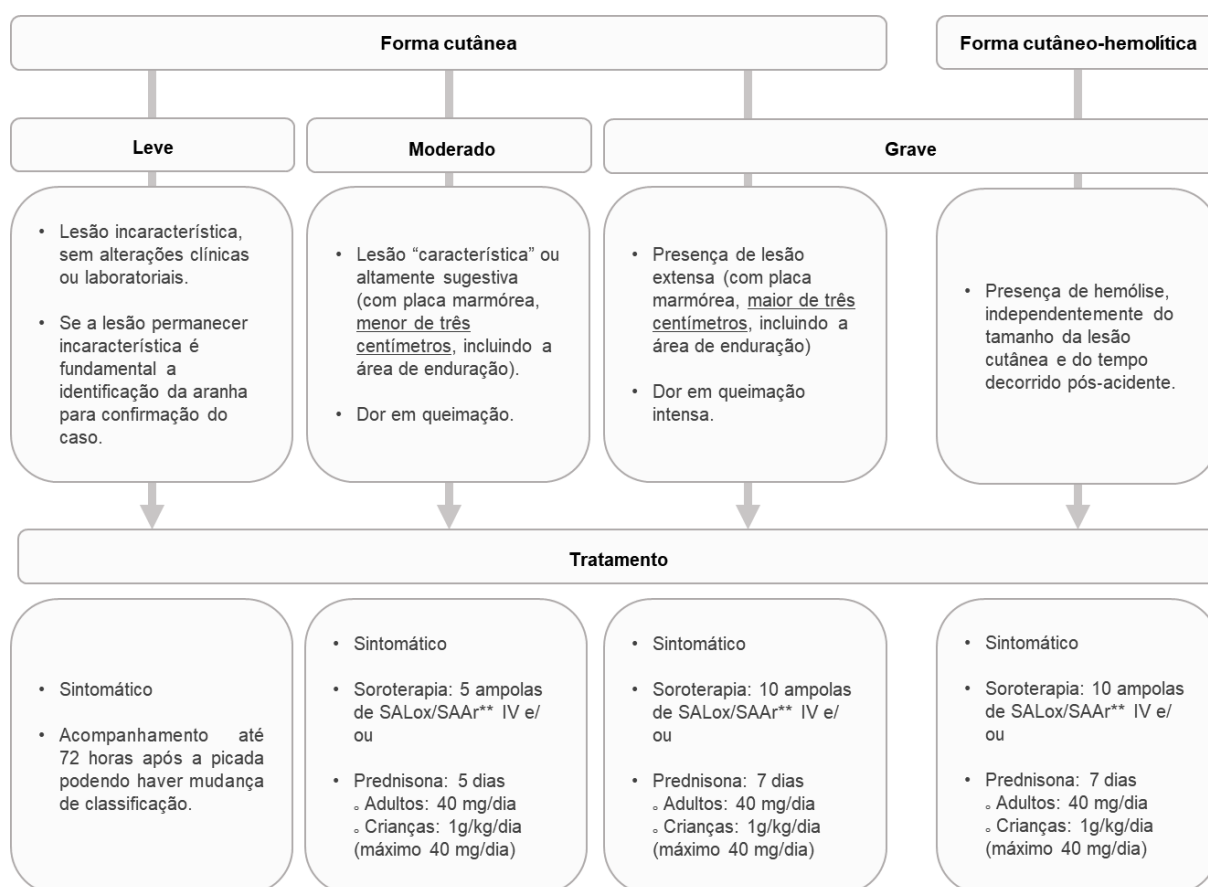


Figura 6: Classificação dos acidentes quanto à gravidade, manifestações clínicas e tratamento geral e específico no loxoscelismo. Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde, Manual de

Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (2001) e Ofício Circular Nº 2 2014-CGDT/DEVIT/SVS/MS. SALox/SAAr IV: soro antiloxoscélico ou soro antiaracnídico, intravenoso.

1.7. *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*

A *Loxosceles amazonica* (Figura 7) é uma espécie que já foi registrada tanto em peridomicílio quanto em intradomicílio nas regiões norte, nordeste e centro-oeste do Brasil, nos estados do Amazonas, Pará, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Mato Grosso, bem como no norte do estado de Minas Gerais (SILVEIRA, 2015 & 2017; ALMEIDA *et al.*, 2017; ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).

A confirmação de loxoscelismo cutâneo causado por *L. amazonica* se limita a um único caso descrito na literatura (Lucas *et al.*, 1983), porém acidentes loxoscélicos nas áreas onde a incidência dessa espécie é confirmada, revelam que efeitos sistêmicos estão presentes em cerca de 13,3% dos casos (Albuquerque *et al.*, 2018). Recentemente, outro artigo registrou acidentes envolvendo aranhas-marrom no estado de Pernambuco, onde também já foi registrada a presença da *L. amazonica* (Amorim *et al.*, 2024). Dentre os casos descritos, a maioria foi classificado como moderado ou grave.

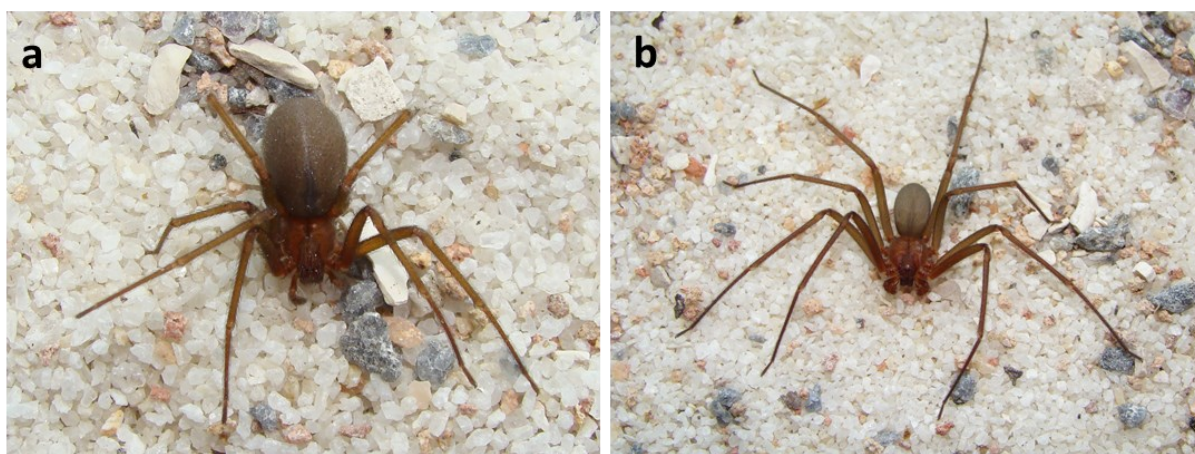


Figura 7: Espécimes de *Loxosceles amazonica*. Fêmea (a) e macho (b) adultos coletados em Serra Branca, Paraíba. Fonte: Adriano L. Silveira

Alguns trabalhos começaram a desvendar o potencial tóxico do veneno de *L. amazonica*, como o de Lopes *et al.*, (2021). Seus resultados revelaram que o veneno de *L. amazonica* apresentou atividade de esfingomielinase e hemólise dependente de

complemento de forma comparável ao veneno de *L. laeta*, sendo as fosfolipases D as principais responsáveis por esta atividade. Além disso, o veneno de *L. amazonica* não induziu morte celular de queratinócitos, sugerindo uma possível toxicidade mais fraca em comparação com o veneno de *L. laeta* (Lopes *et al.*, 2021). Apesar de sua ocorrência em uma vasta área habitada por humanos, e de seu potencial de causar acidentes graves devido a ação do seu veneno, a *L. amazonica* não está atualmente classificada entre as espécies de *Loxosceles* de importância médica no país.

Para o veneno de *Loxosceles amazonica*, já foi demonstrado que ele é imunoreconhecido pelo antiveneno antiaracnídico produzido pelo Instituto Butantan, pelo antiveneno antiloxoscélico produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI) e pelo α LiD1r que é um soro de cavalo desenvolvidos contra toxina dermonecróticas recombinante de *Loxosceles intermedia*. Além disso, esse veneno apresentou atividades proteolíticas, hialuronidases e esfingomielinases. Essas atividades foram pelo menos parcialmente inibidas por antivenenos. Com o sequenciamento de cDNA de fosfolipases D (PLDs), sete novas isoformas putativas foram identificadas no veneno de *L. amazonica* (SILVA-MAGALHÃES *et al.*, 2024).

Já a *Loxosceles variegata* é uma espécie registrada oficialmente no Paraguai e Argentina. Aranhas *Loxosceles* similares a esta espécie tem sido reportados no Brasil, no Estado de Minas Gerais (CHATZAKI *et al.*, 2007; PELLEGRINI; FERREIRA, 2016; BINFORD *et al.*, 2009; WORLD SPIDER CATALOG, 2024). Muitos destes indivíduos foram coletados no município de Ituiutaba no estado de Minas Gerais, inclusive os utilizados no presente trabalho (Figura 8). Porém, apesar de possuírem características semelhantes a *L. variegata*, diferenças morfológicas expressivas foram também encontradas. Assim, necessita-se de uma melhor descrição taxonômica da *L. variegata* para descrever a espécie encontrada em Ituiutaba como sendo realmente pertencente a *L. variegata* ou a uma nova espécie relacionada dentro do gênero *Loxosceles*. Considerando-se isto, optamos por referenciar os espécimes aqui estudados como *Loxosceles aff. variegata*, na qual a abreviatura *aff.*, de *affinis* define terminologia taxonômica utilizada para indicar que uma espécie mencionada é relacionada, mas não idêntica a espécie no binômio que é demonstrado. O veneno de *L. aff. variegata* assim encontrada em Minas Gerais foi caracterizado bioquimicamente e biologicamente parcialmente *in vitro*, porém está em preparação do manuscrito.

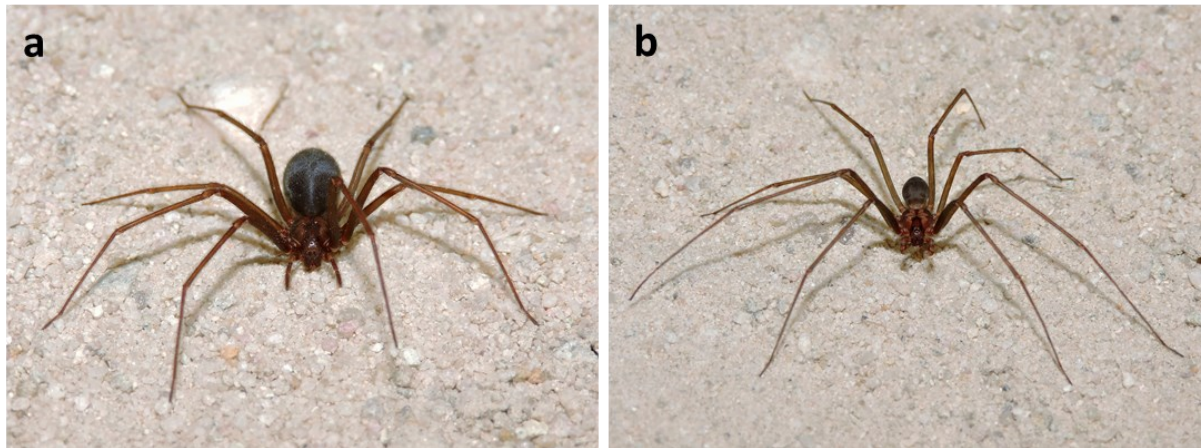


Figura 8: Espécimes de *Loxosceles aff. variegata*. Fêmea (a) e macho (b) adultos coletados em Ituiutaba, Minas Gerais. Fonte: Adriano L. Silveira

As aranhas do gênero *Loxosceles* representam um problema significativo de saúde pública no Brasil, com acidentes que variam de manifestações cutâneas leves a complicações sistêmicas graves. Espécies como *L. amazonica* e *L. aff. variegata*, presentes em algumas regiões brasileira e a prevalência do loxoscelismo pode estar subestimada devido à subnotificação. Ensaio *in vitro* indicam que esses venenos possuem atividades enzimáticas semelhantes às de espécies clinicamente importantes. Portanto, este estudo se propõe a realizar ensaios *in vivo* que serão necessários para compreender melhor os danos causados por essas toxinas e seu impacto no organismo.

2. Objetivos

2.1. Geral

Caracterizar aspectos fisiopatológicos locais, sistêmicos e imunológicos induzidos pelo veneno da aranha marrom *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata* em ensaios *in vivo* e as propriedades hemotóxicas dos venenos em ensaios *in vitro*;

2.2. Específicos

- I. Avaliar *in vitro* a agregação plaquetária, hemólise e atividade fibrinogenolítica causada pelos venenos utilizando componentes sanguíneos humanos.
- II. Avaliar os efeitos macroscópicos locais do envenenamento experimental em coelhos.
- III. Avaliar alterações hematológicas, bioquímicas séricas e imunológicas em amostras coletadas dos coelhos envenenados.
- IV. Determinação a DL50 para cada veneno em modelo murino.
- v. Realizar o envenenamento experimental em camundongos com dose subletal para coleta da urina e rins, para monitorar sinais de lesão renal.

3. Material e Métodos

3.1. Aranhas, venenos e antivenenos

Espécimes de *Loxosceles amazonica* foram coletados na Paraíba no município de Serra Branca e espécimes de *L. aff. variegata* foram coletados em Minas Gerais no município de Ituiutaba (Licença SISBIO: 21102-9 e 21102-11, SISGEN: A651423). Todas as aranhas foram identificadas e mantidas no Aracnidário da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), sendo alimentadas a cada duas semanas com grilos. O veneno das *Loxosceles* foi obtido por microdissecção das glândulas de veneno, com as aranhas anteriormente anestesiadas pela redução da temperatura corporal. Após a remoção, as glândulas foram maceradas com auxílio de capilares, em água Milli-Q, centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até o uso. O teor de proteína foi determinado usando o DC Protein Assay (Bio-Rad), usando a albumina de soro bovino como padrão.

3.2. Ensaios *in vitro*

3.2.1. Ensaios de agregação e inibição plaquetária

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FUNED - CAAE: 52987121.4.0000.9507), o sangue humano de doadores saudáveis livres de anti-inflamatórios não esteroidais foi coletado em tubos a vácuo contendo ácido-citrato-dextrose (ACD) e, para obter plaquetas lavadas, a centrifugação inicial é de 1300 rpm, 15 minutos a 37°C. Para avaliar os efeitos dos venenos brutos estudados na agregação plaquetária, plaquetas humanas foram isoladas e lavadas de acordo com Sanchez et al. (2016). Ao término da lavagem, as plaquetas foram ressuspensas em Tyrode pH=7,4, e o número foi ajustado para $2,5 \times 10^5$ /plaquetas/ μ L. No ensaio de agregação plaquetária, 225 μ L das plaquetas lavadas foram incubadas com 25 e 50 μ g dos venenos brutos, e a agregação foi monitorada medindo a transmitância em um agregômetro plaquetário AggRAM (Remote Aggregation Analyzer, Helena Laboratories, USA) sob agitação de 600 rpm a 37°C, durante 10 minutos.

Para os ensaios de inibição da agregação plaquetária, 225 μL de plaquetas lavadas foram ré-incubadas com 25 μg e 50 μg dos venenos em solução de Tyrode pH 7,4 por 3 minutos. Posteriormente, as plaquetas foram estimuladas pela adição de alguns agonistas: 10 $\mu\text{g/mL}$ por ensaio de Colágeno e 0,3 mg/mL de Convulxina, foi adicionado veneno nas mesmas condições anteriormente descritas, e o monitoramento da agregação foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente no agregômetro plaquetário AggRAM. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, com controles negativo (plasma rico em plaquetas) e controles positivos (plasma rico em plaquetas com agonistas agregadores de plaquetas).

3.2.2. Atividade hemolítica

O sangue humano dos doadores foi coletado em tubos de vácuo contendo ácido etilenodiaminetetraacético (EDTA) e fenotipados utilizando os anticorpos anti-A monoclonal (Lorne laboratories limited), anti-B (Lorne laboratories limited) e o anti-D monoclonal, além do controle negativo Rh (ASEM-NPBI Produtos Hospitalares Ltda). Após centrifugação a 170 xg por 15 minutos para remover o plasma rico em plaquetas, os eritrócitos foram lavados 3 vezes com a solução de Lactato de Ringer (0,6% NaCl, 0,03% KCl, 0,02% CaCl, 0,31% lactato de sódio), sendo centrifugados a 2000rpm por 3 min entre as lavagens. Mais tarde, os eritrócitos lavados foram resuspendidos em Ringer Lactato em uma concentração final de 5×10^8 células/mL. Um volume de 200 μL de glóbulos vermelhos lavados (1×10^8) foram adicionados a cada tubo Eppendorf contendo 200 μL de cada diluição seriada dos venenos (25 μg a 3,125 μg). Os ensaios foram realizados em duplicata, tendo oito experimentos independentes por veneno, com controles negativos (glóbulos vermelhos em lactato de ringer) e positivos (glóbulos vermelhos em 0,01% (v/v) de Triton X-100. Depois de 20 h de incubação com agitação suave, controles e as amostras foram centrifugadas por 5 min a 1000 rpm, e a absorbância dos sobrenadantes foi lida a 550nm (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific). Os valores de absorbância foram convertidos em percentuais de hemólise usando os valores de absorbância do controle positivo como 100% de lise dos eritrócitos (MOREIRA, 2008; KARIM-SILVA et al., 2016).

3.2.3. Atividade fibrinogenolítica

3.2.3.1. Zimograma

O zimograma foi feito usando SDS-PAGE 12%, contendo 5mg/mL de fibrinogênio bovino incorporado ao gel previamente a polimerização. Os venenos foram diluídos em tampão de amostra sob condições não redutoras e submetidas a eletroforese com duração de 1 hora a 50V e depois 100V em ambiente refrigerado. Após a corrida, os géis foram lavados em Triton X-100 a 2,5% (v/v), por 1 hora para a retirada do SDS do gel, em seguida, incubados overnight à 37° C, em 1M de tampão fosfato pH 8,0, sendo então corados pelo azul de Coomassie. As regiões claras lisadas do substrato contra um fundo de coloração azul indicam a presença da degradação enzimática, ou seja, presença da atividade fibrinogenolítica. Para os ensaios de inibição, após a lavagem com o Triton X-100 a 2,5% (v/v), o gel foi incubado separadamente com 2,0 mM de EDTA, 5,0 mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) e 3 mM de 1,10 fenantrolina para determinar qual proteinase correspondia a qual classe de enzima (CAMPOS et al., 2012).

3.2.3.2. Ensaio de digestão de fibrinogênio

A atividade fibrinogenolítica dos venenos foi também determinada por um ensaio de digestão de fibrinogênio, conforme descrito por Medina-Santos (2019), com modificações. Uma quantidade equivalente a 3 µg de veneno foram adicionados a 50µL de uma solução contendo 2,5 mg/mL de fibrinogênio diluído em tampão Tris-HCl 25mM contendo NaCl 0,15M (pH 7,4) e incubados por 16h a 37°C. Após esse período, 50µL de solução desnaturante (10M de uréia, 4% de β-mercaptoetanol, 4% de SDS) foram adicionados e esta mistura foi incubada em temperatura ambiente por mais 16h. Em seguida, 10µL da amostra foi adicionado a 10µL de tampão de amostra em condições redutoras e analisado por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12%, posteriormente corado com Coomassie blue. Para estimar a degradação do fibrinogênio pelo veneno, a densidade das bandas de fibrinogênio foi medida por quantificação de pixels usando o software Image J 1.51.

3.3. Ensaio in vivo

3.3.1. Modelo experimental de loxoscelismo cutâneo em coelhos

3.3.1.1. Animais e protocolo experimental de dermonecrose

Para a quantificação dos efeitos locais dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata*, o envenenamento experimental em coelhos se deu pela inoculação de 10µg de veneno total por kg do animal (C1LaV: 2,04 Kg; C2LaV: 2,01 Kg; C3LaV: 2,21 Kg; C1LvV: 2,38 Kg; C2LvV: 2,34 Kg; C3LvV: 2,23 Kg) diluídas em 100µL de PBS e injetadas via intradérmica no dorso depilado dos coelhos, sendo utilizados 3 animais para cada veneno testado. Essa quantidade de animais e a dose foi baseada através de um levantamento na literatura, conforme a tabela 1. Após o envenenamento, os animais foram avaliados quanto área de necrose. Todas essas medidas foram feitas antes (0h) e após da inoculação do veneno total, em 0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 17 dias e 21 dias.

Tabela 1: Levantamento de dados experimentais de dermonecrose induzida por venenos loxoscélicos.

Artigos	Veneno	Quantidade (µg)	nº	Lesão
Alvarenga et al., 2002	<i>Loxosceles intermedia</i>	10	2	1.00 cm ²
Appel et al., 2008	<i>Loxosceles intermedia</i>	10	3	1.00 cm ²
Arán-Sekul et al., 2020	<i>Sicarius thomisoides</i>	50	3	0.65 cm ²
Barbaro et al., 2005	<i>Loxosceles deserta</i>	5	?	~0.3 cm ²
	<i>Loxosceles gaucho</i>			
	<i>Loxosceles reclusa</i>			
	<i>Loxosceles intermedia</i>			
	<i>Loxosceles laeta</i>			
Calabria et al., 2019	<i>Loxosceles sp.</i>	6	2	nd
Chatzki et al., 2012	<i>Loxosceles similis</i>	10	1	1.00 cm ²
da Silveira et al., 2006	<i>Loxosceles intermedia</i>	10	3	1.00 cm ²
da Silveira et al., 2007	<i>Loxosceles intermedia</i>	10	3	1.00 cm ²
Felicioni et al., 2006	<i>Loxosceles intermedia</i>	7	?	1.00 cm ²
Gomez et al., 1999	<i>Loxosceles deserta</i>	3	3	nd
Gomez et al., 2001	<i>Loxosceles reclusa</i>	3	3	nd
Guimarães et., 2013	<i>Loxosceles laeta</i>	10	5	0.50 cm ²
Magalhães et al., 2013	<i>Loxosceles gaucho</i>	3	3	1.20 cm ²
Miranda et al., 2022	<i>Loxosceles intermedia</i>	7	5	1.08 cm ²
Ospedal et. al., 2002	<i>Loxosceles intermedia</i>	40	3	nd
Paixão-Cavalcanti et al., 2007	<i>Loxosceles intermedia</i>	5	12	1.00 cm ²
Pretel et al., 2005	<i>Loxosceles adalaida</i>	5	4	0.80 cm ²
Souza et al., 2018	<i>Loxosceles intermedia</i>	9	3	nd
Vuitika et al., 2013	<i>LiRecDT7</i> (toxina recombinante)	10	2	nd
Média		11,21	3,53	

3.3.1.2. Coleta e processamento das amostras de sangue

Foram coletadas amostras de sangue dos coelhos em tempos previamente definidos, nos momentos 0,4,24,48,72,168 e 336 horas. As amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia safena da perna traseira dos coelhos, utilizando sistema de escalpe a vácuo 23G 3/4" (gt group, lote: 20221105, validade: 04/11/2024) e tubos a vácuo contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%, para obtenção de sangue total para realização do hemograma e plasma para exames bioquímicos e imunológicos, tubo contendo ativador de coágulo (Accuvet, validade: 06/2025) para obtenção de soro para exames bioquímicos, e tubo contendo anticoagulante citrato de sódio 3,2%, para obtenção de plasma citratado para realização de exames de hemostasia. O soro e os plasmas foram obtidos através da centrifugação das amostras em 3500 rpm por 10 minutos e 3.000 rpm durante 15 minutos respectivamente. Em seguida, as amostras foram alíquotas e congeladas a -80 °C para uso posterior.

3.3.1.3. Hemograma

O hemograma foi processado em um analisador hematológico automatizado (Hemacounter 60, Hemogram) para a determinação de valores referentes a leucócitos totais (WBC), linfócitos absolutos (LYM#), monócitos absolutos (MID#), granulócitos absolutos (GRAN#), hemácias totais (RBC), hemoglobina (HGB), concentração de hemoglobina corpuscular Média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como desvio padrão (RDW-SD), hematócrito (HCT), plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (VPM), amplitude de distribuição de plaqueta (PDW), plaquetócrito (PCT) e taxa de células grandes e plaquetas (P-LCR).

3.3.1.4. Perfil bioquímico

Para as análises bioquímicas, foram utilizados kits comerciais (Labtest) para dosagem de amilase, proteínas totais, uréia, creatinina K, Creatinofosfoquinase (CK

NAC), creatinofosfoquinase fração MB (CKMB), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e aspartato aminotransferase (Gama GT), seguindo as instruções do fabricante. Essas análises foram realizadas em parceria com a Labtest, sendo executadas no local.

3.3.1.5. Perfil inflamatório

A determinação das concentrações de IL-6, TNF- α e IL-8 no plasma dos coelhos foi conduzida utilizando kits Rabbit IL6 (*Interleukin 6*) ELISA Kit, Rabbit TNFa (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) ELISA Kit e Rabbit IL8 (*Interleukin 8*) ELISA Kit, respectivamente, da *ELK Biotechnology*, seguindo as orientações do fabricante. Inicialmente, foram adicionados 100 μ L de padrão (diluído conforme as instruções) ou 100 μ L de amostra a cada poço, seguido de incubação a 37°C por 80 minutos. Após três lavagens utilizando 200 μ L de Tampão de Lavagem em cada poço, adicionou-se 100 μ L da solução de trabalho de anticorpo biotilado diluída a cada poço, seguida de incubação a 37°C por 50 minutos. Após decorrido o tempo, realizou-se uma nova lavagem, conforme descrito anteriormente, e adicionou-se 100 μ L de solução de trabalho Streptavidin-HRP a cada poço, incubando a 37°C por 50 minutos. Após cinco lavagens, adicionou-se 90 μ L de Solução de Substrato TMB a cada poço, seguida de incubação a 37°C por 20 minutos no escuro. A reação foi interrompida com 50 μ L de solução de paragem, e as absorbâncias foram medidas a 450nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific).

3.3.2. Modelo experimental de loxoscelismo sistêmico em camundongos

3.3.2.1. Animais e protocolo experimental de DL50

Para verificar se os venenos eram capazes de induzir toxicidade letal, camundongos Swiss, pesando aproximadamente 18-22g e com cerca de 6-8 semanas, receberam injeção subcutânea, em um volume de 200 μ L, dos venenos a serem testados. Inicialmente, foram realizados 3 ensaios exploratórios com 3 animais

em cada um (n=9), para cada um dos dois venenos. No 1º ensaio, foi utilizando o valor médio de DL50 descrito na literatura para venenos loxoscélicos, sendo 12µg. De acordo com o resultado obtido, a dose foi aumentada ou diminuída até que se chegou no intervalo ideal para o ensaio de DL50. Para o ensaio propriamente dito, foram utilizados 5 grupos de 5 animais cada (n=25) para cada veneno, utilizando doses crescentes de cada veneno. A dose média letal (DL₅₀) foi calculada pela análise Probit de mortes ocorridas dentro de 72 horas após a injeção de veneno.

3.3.2.2. Coleta, eletroforese e análise das urinas

Para analisar os efeitos dos venenos loxoscélicos no rim, foi realizado o envenenamento experimental de 5 camundongos com uma dose equivalente a ½ DL₅₀ determinada para cada veneno (via subcutânea, volume 200µl). No tempo 0 e após 6, 24, e 72h, as urinas dos camundongos de cada grupo já citado acima foram coletadas com uma micropipeta mediante massagem abdominal. Para realização do perfil das urinas e detecção de albumina, 1 µL de urina dos camundongos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições redutoras e corados com Coomassie Brilhante Azul. Albumina bovina (5ug) foi utilizada como controle. A análise química das urinas foi realizada com tira reagente Uriquest Plus I – Labtest (Validade: 07/2023 Lot: 1313/0136), pipetando 5 µL de urina dos camundongos em cada área da tira a ser analisada.

3.3.2.3. Avaliação histopatológica

A necropsia dos camundongos foi realizada após a eutanásia utilizando 200 µL de tiopental, quando foram coletados os rins para a avaliação histopatológica renal. Para a análise histopatológica, os rins dos animais experimentalmente envenenados foram fixados com glutaraldeído 4%, desidratadas por uma sequência de álcool em diferentes porcentagens e incluídas em Glicol metacrilato, utilizando o *Leica Historesin Embedding Kit*. Em seguida, cortes de aproximadamente 4µm foram obtidos e corados com Azul de toluidina para análise em microscópio.

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.0). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, considerando conjuntos de dados com valores de p superiores a 0,05 como paramétricos. Nos ensaios de hemólise, os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas, os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$, e as amostras foram testadas em duplicata, em pelo menos dois ensaios independentes. Nos testes hematológicos e bioquímicos, para os valores que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, comparando com o tempo 0. Já para os testes com valores não paramétricos, a análise foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's para comparações múltiplas, comparando com o tempo 0.

4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaios *in vitro*

4.1.1. Ensaios de agregação e inibição plaquetária

O loxoscelismo representa um problema de saúde pública devido os seus efeitos patofisiológicos, alterações funcionais no corpo que ocorrem em resposta ao envenenamento, tendo como manifestações sistêmicas mais graves a trombocitopenia, hemólise intravascular, coagulação intravascular disseminada e a lesão renal aguda (LOPES *et al.*, 2020; ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; MALAQUE *et al.*, 2002). Assim, para verificar a ação dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* sobre as plaquetas humanas, realizamos o ensaio de agregação e inibição plaquetária utilizando plaquetas lavadas. O veneno da *L. amazonica* induziu a agregação plaquetária espontânea, quando utilizado 50 µg do veneno bruto (Figura 9), e essa alteração fisiológica decorrente do envenenamento já foi observada em outras espécies de *Loxosceles*, como a *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. reclusa* (KURPIEWSKI *et al.*, 1981; BERTONI DA SILVEIRA *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2013). Não foi observada essa capacidade para o veneno de *L. aff. variegata*.

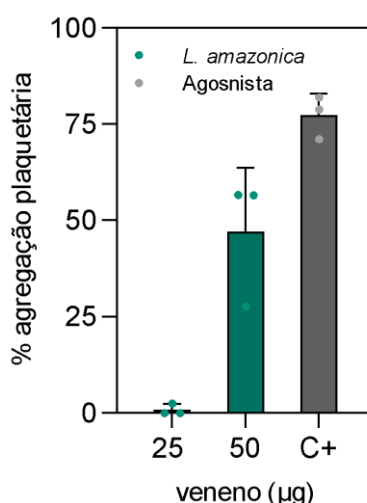


Figura 9: Efeito do veneno bruto de *Loxosceles amazonica* na agregação plaquetária. Agregação plaquetária com *Loxosceles amazonica* usando como C+ o colágeno. Plaquetas lavadas foram incubadas com 25µg e 50µg de veneno de *L. amazonica*. A agregação foi

monitorada medindo a transmitância da luz por 10 minutos por um agregômetro. Média $\pm$ desvio padrão são mostrados.

De maneira contrária, o veneno de *L. aff. variegata* teve um potencial para inibir a agregação de plaquetas lavadas, quando utilizado o veneno bruto nas concentrações de 25 μ g e 50 μ g (Figura 10A e 10B), porém teve um potencial inibidor maior para reduzir a agregação plaquetária induzida pelo Colágeno (Figura 10A) quando comparado a inibição com a utilização do agonista Convulxina. Essa propriedade não foi observada para o veneno de *L. amazonica*.

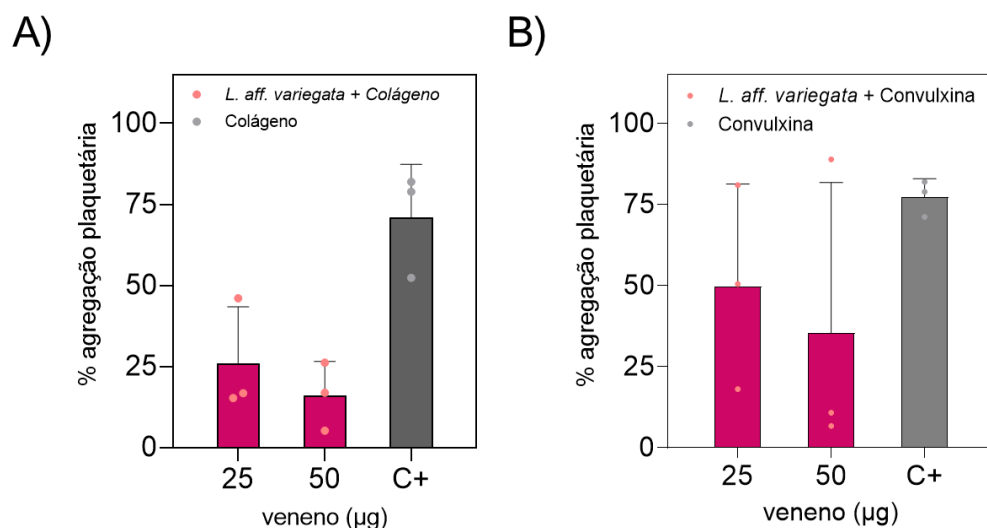


Figura 10: Efeito do veneno bruto de *Loxosceles aff. variegata* nos agonistas colágeno (A) e convulxina (B) em relação ao seu potencial para inibir a agregação de plaquetas lavadas. Suspensão de plaquetas humanas lavadas foram pré-incubados com diferentes concentrações do veneno bruto de *L. aff. variegata* (25 e 50 μ g) sob agitação 600rpm a 37 °C. Após 3 min de incubação, os agonistas foram adicionados as Plaquetas lavadas sob agitação a 600 rpm a 37°C. A agregação foi monitorada medindo a transmitância da luz por 7 minutos por um agregômetro. Média $\pm$ desvio padrão são mostrados.

As fosfolipases D (PLDs) nos venenos de *Loxosceles* são fatores chave na patofisiologia do envenenamento, causando respostas inflamatórias exacerbadas, hemólise intravascular e coagulopatias, que são características do loxoscelismo sistêmico. Estudos demonstraram que as PLDs estão relacionadas à agregação

plaquetária, com propriedades de indução da agregação dependentes da concentração. Algumas PLDs recombinantes apresentam percentuais de agregação semelhantes aos do veneno bruto (APPEL *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; FELICORI *et al.*, 2006).

No estudo de Fukuda *et al.*, (2017), os dados indicam que, embora essa toxina exija componentes plasmáticos para promover a agregação plaquetária, esses componentes não são necessários para a ligação da PLD recombinante do veneno de *L. gaucho* (LgRec1) às plaquetas. Além disso, a ligação de LgRec1 à membrana celular de plaquetas humanas sugere a exposição de fosfatidilserina, que pode atuar como um suporte para fatores de coagulação, explicando assim a necessidade de componentes plasmáticos para promover a agregação plaquetária.

Já nos estudos de Tavares *et al.*, (2011) foi demonstrado que o veneno de *L. gaucho* e sua fração esfingomielinase desencadeiam as principais funções plaquetárias em plaquetas humanas e de coelho, justificando o uso do coelho como modelo animal experimental para investigar os distúrbios plaquetários induzidos por venenos de *Loxosceles*. Futuras investigações sobre o papel das plaquetas na patogênese do loxoscelismo podem ajudar a desenvolver intervenções terapêuticas mais eficazes após o envenenamento. Animais trombocitopênicos desenvolveram um quadro mais grave na progressão e resolução da lesão dermonecrótica induzida pelo veneno de *Loxosceles*, sugerindo que as plaquetas têm um papel protetor durante o desenvolvimento da lesão (TAVARES *et al.*, 2016).

O ensaio realizado buscou entender como os venenos de diferentes espécies de *Loxosceles* afetam a agregação plaquetária, o que pode ajudar a explicar alguns dos efeitos sistêmicos no loxoscelismo, como hemólise intravascular e coagulopatias. Para transpor esses resultados para a clínica, seria necessário realizar estudos clínicos adicionais para confirmar os efeitos observados *in vitro* em pacientes humanos.

4.1.2. Curva dose-resposta da atividade hemolítica direta dos venenos de *L. amazonica* e de *L. aff. variegata*

Um dos achados clínicos do loxoscelismo sistêmico é a hemólise intravascular, seguida de anemia hemolítica aguda, causada pela capacidade do veneno de lisar hemácias e liberar hemoglobina no sistema sanguíneo, podendo levar a alterações no hemograma, com a queda no número de eritrócitos, diminuição da concentração de hemoglobina, reticulocitose, icterícia e alterações na urina, incluindo hemoglobinúria, bilirrubinúria e proteinúria baseado em evidências clínicas desses achados foram visualizados em vítimas de envenenamento (DE SOUZA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2022; MALAQUE *et al.*, 2011). Para avaliar a capacidade hemolítica dos venenos loxoscélicos sobre eritrócitos humanos foram realizados experimentos que avaliaram sua capacidade em desencadear hemólise direta de eritrócitos humanos em ensaios “*in vitro*”. Os resultados da hemólise foram expressos em porcentagem, comparando os valores das amostras com o do controle positivo, contendo Triton 0,01%, para o qual considerou-se 100% hemólise. Além disso, utilizou-se como controle negativo eritrócitos incubados somente com ringer lactato, onde não deveria ser observada hemólise para garantir que as condições do ensaio estavam adequadas. Os resultados dos experimentos (Figura 11A) mostram uma diferença significativa na atividade hemolítica quando comparado as espécies, tendo a *L. gaucho* e a *L. aff. variegata* como a espécie que desencadeia maior e menor hemólise, respectivamente.

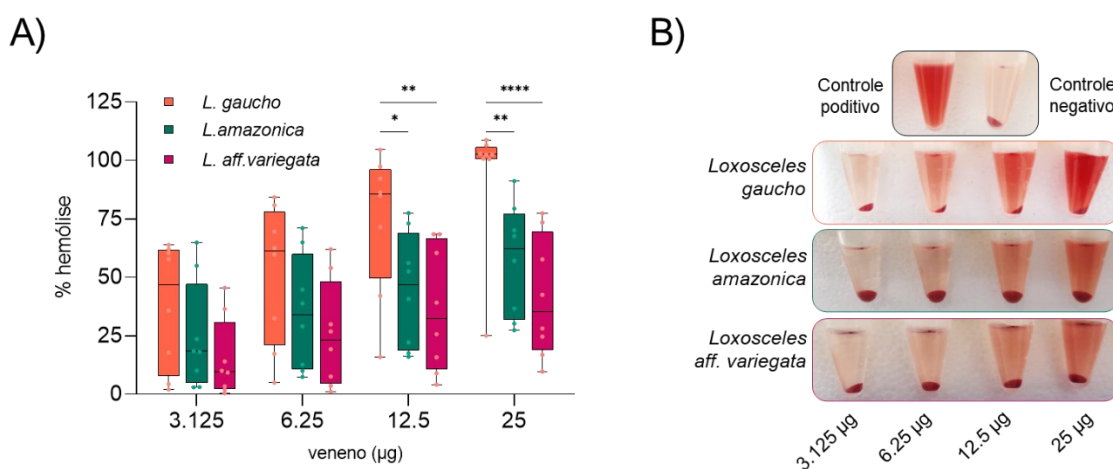


Figura 11: Ensaio hemolítico *in vitro*. Hemácias lavadas foram incubados com os venenos de *Loxosceles amazonica*, *L. aff. Variegata* e *L. gaucho* por 20h sob agitação suave. Após esse

tempo, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram lidos a 550nm. (A) Percentual de hemólise considerando o Triton X-100 (controle positivo) como 100%. (B) Solução de Ringer Lactato, hemácias, venenos e controles após incubação e centrifugação. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

Sabe-se que as PLDs podem induzir a hemólise tanto na presença (hemólise indireta) quanto na ausência de soro (hemólise direta) (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; TAMBOURGI *et al.*, 2000b). O estudo de Magalhães *et al.*, (2013) mostraram que uma fosfolipase D (PLD) recombinante da *L. gaucho*, denominada LgRec1, assim como o veneno bruto da aranha, causou apenas hemólise leve (cerca de 20%) em uma concentração de 25 µg/mL. No estudo de Fukuda *et al.*, (2017), a LgRec1 ligada e não ligada à EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) foi testada, tanto na presença quanto na ausência de soro. Os resultados mostraram que ambas as formas da toxina eram capazes de promover a hemólise, embora a hemólise direta fosse mais proeminente somente após 12 horas de exposição. No entanto, diferenças notáveis nos valores de hemólise foram observadas ao comparar os efeitos do veneno de *L. gaucho* em diferentes concentrações.

De forma complementar, o estudo de Chaves-Moreira *et al.*, (2009) forneceu evidências de que a PLD do veneno de *L. intermedia* pode desencadear hemólise direta em células sanguíneas humanas. Além disso, o estudo de Justa *et al.*, (2023), todas as três PLDs recombinantes analisadas apresentaram atividade hemolítica direta. A PLD de *L. gaucho* teve a maior atividade, com 93% de hemólise em 24 horas. As PLDs de *L. intermedia* e *L. laeta* tiveram atividades de 79% e 75% em 24 horas, respectivamente, mas as diferenças entre elas não foram estatisticamente significativas, reforçando o papel dessas toxinas no mecanismo de ação hemolítica em diferentes espécies de *Loxosceles*.

Os resultados aqui apresentados demonstram que os venenos de *Loxosceles amazonica* e *L. aff. variegata* possuem atividade hemolítica direta sobre eritrócitos humanos, pois nas condições experimentais utilizadas não houve participação do sistema complemento no processo de lise celular, uma vez que o ensaio foi realizado na ausência de plasma. A hemólise dependente de complemento já foi observada para *L. intermedia* (MOREIRA, 2008), *L. laeta*, *L. willianilsoni* e *L. amazonica* (LOPES

et al., 2021). E também a hemólise não dependente de complemento para *L. gauchoi*, *L. intermedia* e *L. laeta* (JUSTA *et al.*, 2023).

Os resultados de Lopes *et al.*, (2021), mostraram, que eritrócitos tratados com venenos de *L. amazonica* apresentam PLDs em suas membranas, mas significativamente em menor quantidade, quando comparados ao veneno de *L. laeta*. Desse modo, pode-se afirmar que a hemólise de *L. amazonica* ocorre tanto indiretamente como diretamente. Além disso, o efeito hemolítico demonstrou ser diretamente proporcional à quantidade de veneno utilizada. As espécies de *Loxosceles* estudadas no presente trabalho não são tipicamente consideradas de interesse médico no Brasil. Entretanto, os resultados obtidos apontam para uma toxicidade relevante sobre o sangue humano, indicando que seus venenos têm o potencial de causar danos significativos.

4.1.3. Avaliação da interferência dos sistemas ABO e Rh na hemólise direta

Dada a grande variabilidade observada nas amostras de sangue de diferentes doadores no ensaio de hemólise realizado, os dados obtidos foram reanalisados por meio do agrupamento dos tipos sanguíneos. O objetivo dessa análise foi verificar a hipótese de que os antígenos dos sistemas ABO e Rh poderiam interferir na atividade hemolítica dos venenos de *Loxosceles*. Analisamos uma amostra de sangue A-, duas de A+, uma de B-, uma de B+, uma de AB-, uma de AB+, duas de O+ e duas de O-, todas confirmadas por tipagem sanguínea. A análise foi realizada com a ciência de que o tamanho amostral testado neste experimento é pequeno, dada a raridade de alguns tipos sanguíneos e também pela limitação da quantidade de veneno disponível. Entretanto, apesar das conclusões possíveis à partir do experimento serem limitadas, acreditamos serem dados importantes a serem narrados para posterior comprovação mais robusta.

Ao agrupar os dados de acordo com o sistema ABO e Rh, verificou-se que os tipos sanguíneos com mais antígenos na membrana eritrocitária, como o AB+, apresentaram níveis mais baixos de hemólise quando comparados aos tipos A+, O+ e B+ (Figura 12A). Uma exceção foi o sangue do tipo B+, que apresentou maior

hemólise quando incubado com o veneno de *L. gaucho*. Entre os eritrócitos Rh-negativos, as taxas mais altas de hemólise foram observadas no tipo O-, seguido por AB-, A- e B-. (Figura 12A). Além disso, pretendendo a análise da influência do sistema ABO na susceptibilidade à hemólise, as amostras foram reagrupadas considerando-se amostra do A, B, O e AB (Figura 12B). Foi observado que os diferentes tipos sanguíneos ABO são igualmente suscetíveis à hemólise, independente da dose de veneno e da espécie. Não houve diferença significativa quando realizado o teste *two-way anova* para ambos os agrupamentos das amostras (Figura 12A-B).

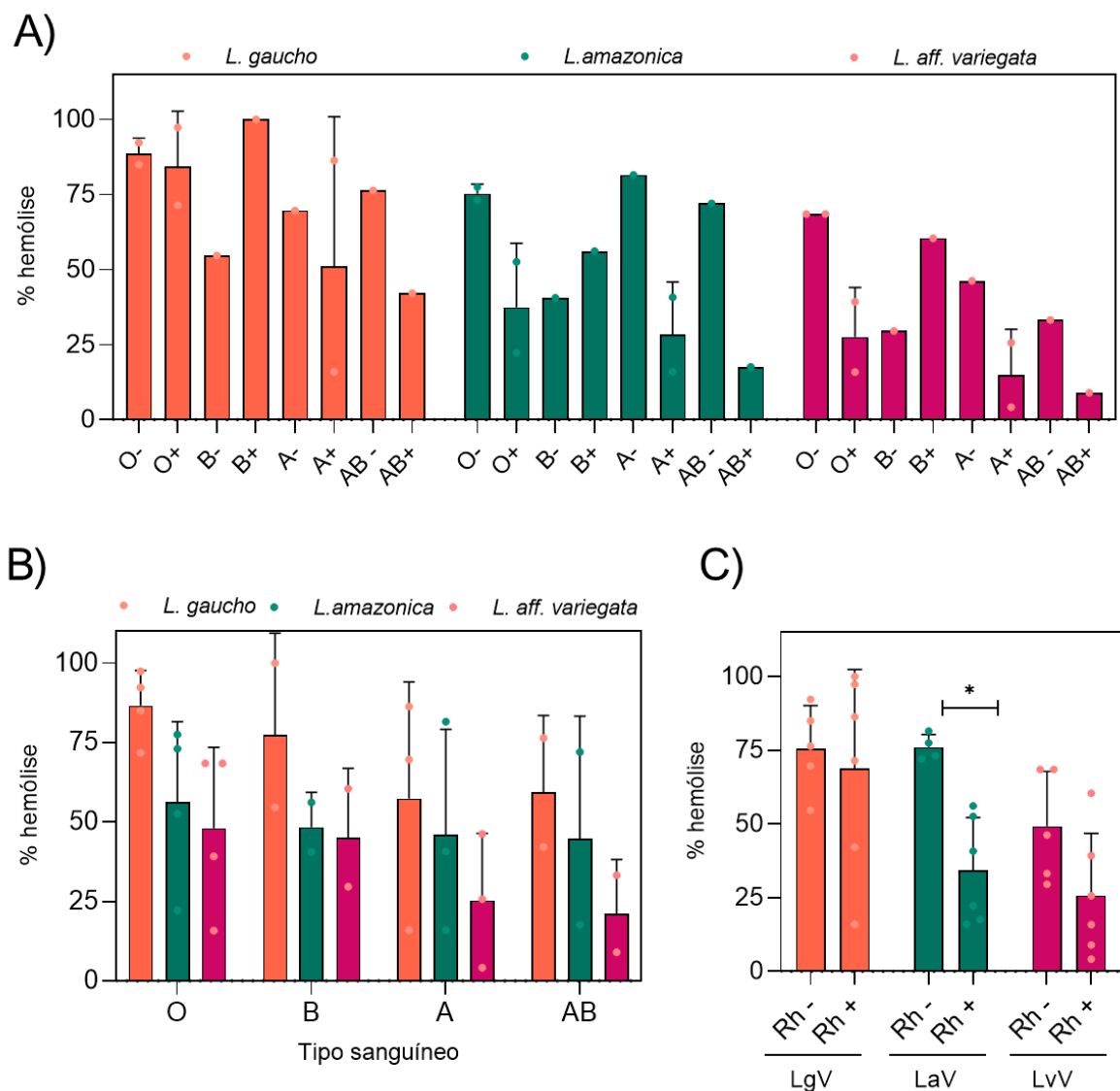


Figura 12: Influência dos Sistemas ABO e Rh na atividade hemolítica direta de venenos loxoscélicos. Os tipos sanguíneos foram incubados com 12,5 µg de diferentes venenos de

Loxosceles por 20 horas. A) Influência dos sistemas ABO e Rh na atividade hemolítica direta. B) Média das porcentagens de hemólise por tipo sanguíneo e por espécie na atividade hemolítica direta. C) Média das porcentagens de hemólise por tipo de fator Rh e por espécie na atividade hemolítica direta. Média $\pm$ desvio padrão expressos em porcentagem são mostrados. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. LaV - veneno de *Loxosceles amazonica*. LgV - veneno de *Loxosceles gaucho*. LvV - veneno de *Loxosceles aff. variegata*.

Visando a análise da influência do fator Rh na susceptibilidade à hemólise, as amostras foram reagrupadas considerando-se apenas aquelas com o fator positivo ou negativo. A Figura 12C mostra que os eritrócitos Rh-negativos são mais suscetíveis à hemólise induzida pelos venenos de *Loxosceles* do que os Rh-positivos, de maneira estatisticamente significativa para o veneno de *L. amazonica*. Esse efeito pode estar relacionado à ação das fosfolipases D, presentes nos venenos, que degradam os fosfolipídios presentes nas membranas celulares, inclusive nos eritrócitos, resultando em hemólise (TAMBOURGI *et al.*, 1998a, 2000a). Assim, a hipótese levantada é que a ausência do antígeno Rh nos eritrócitos Rh-negativos pode facilitar a interação do veneno com a membrana celular, tornando-os mais vulneráveis à ação das fosfolipases D.

No estudo de Tijani *et al.*, (2023), foi observado que os diferentes tipos sanguíneos ABO são igualmente suscetíveis a infecções por *Babesia divergens*. Já no estudo de Dahlén *et al.*, (2021), foram encontradas 49 associações entre doenças e grupos sanguíneos ABO, e 1 associação com RhD. Descobriu-se, por exemplo, que o grupo sanguíneo B tem um risco reduzido de cálculos renais em comparação ao grupo O, e que os grupos A e AB e RhD positivo têm maior risco de hipertensão induzida pela gravidez em comparação ao grupo O e o RhD negativo.

Por outro lado, um estudo sobre *Loxosceles intermedia* não encontrou diferenças significativas na hemólise entre eritrócitos Rh-positivos e Rh-negativos, contrapondo nossos resultados (MOREIRA, 2008). Tendo em vista a tendência apontada em nosso estudo, são necessários mais estudos e um número maior de amostras para explorar essas interações em mais detalhes e verificar se

possivelmente estaria relacionado ao tipo de veneno, que pode apresentar particularidades quanto a esse aspecto.

4.1.4. Atividade fibrinogenolítica

As metaloproteases desempenham um papel crucial na patogênese do loxoscelismo, como a clivagem da fibronectina e do fibrinogênio (DA SILVEIRA *et al.*, 2002; FEITOSA *et al.*, 1998). Essas proteases atuam em constituintes moleculares da matriz extracelular plasmática, como fibrinogênio e fibronectina, e em moléculas da membrana basal, como entactina e proteoglicano de sulfato de heparano. Essas ações podem resultar em hemorragia no local da picada, dificuldade na cicatrização de feridas, insuficiência renal e disseminação de outras toxinas por todo o corpo, causando instabilidade dos vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade (LUCIANO *et al.*, 2004; VEIGA *et al.*, 2001; ZANETTI *et al.*, 2002).

Para verificar se os venenos loxoscélicos das espécies estudadas possuem atividade proteolítica sobre fibrinogênio, foi realizado um ensaio de degradação do fibrinogênio, em dois formatos diferentes. No zimograma, o fibrinogênio foi incorporado na malha do gel de poliacrilamida e posteriormente a corrida, foi deixado *overnight* em tampão fosfato pH 8,0 para que a reação ocorresse. Na figura 13A, vemos a presença de regiões claras que representam que houve degradação enzimática pelos venenos, confirmando a presença de atividade proteolítica nos venenos, principalmente nos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata*. Não foi possível detectar a atividade no controle feito com o veneno de *L. gaucho*. Esse resultado foi inesperado, uma vez que o veneno dessa espécie já demonstrou possuir enzimas proteolíticas (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). O tratamento do gel com EDTA e a Fenantrolina (Figura 13B e 13C), ambos inibidores de metaloproteases, resultou na perda de atividade das proteinases de forma semelhante que foram observadas no ensaio de atividade fibrinogenolítica na Figura 13A. Em contraste, quando tratado o gel com o PMSF (inibidor de serino proteases) não mostrou nenhuma inibição sobre as proteinases observadas (Figura 13D).

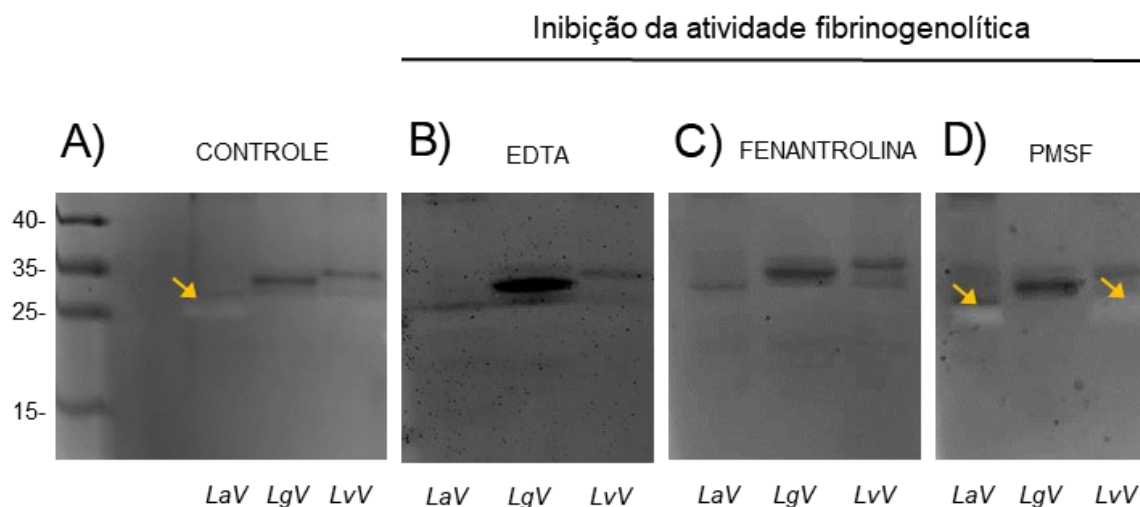


Figura 13: Zimograma da atividade fibrinogenolítica dos venenos loxoscélicos (A) e inibição da atividade através do uso dos inibidores (B) EDTA, (C) Fenantrolina e (D) PMSF. Setas em amarelo apontam para regiões claras que representam onde há presença de degradação enzimática pelos venenos.

Foi também realizado o ensaio direto, no qual o veneno é incubado diretamente com o fibrinogênio bovino e posteriormente analisado por SDS-PAGE. (Figura 14). Neste ensaio, é possível ver as três cadeias polipeptídicas do fibrinogênio, a cadeia alfa (α), Beta (β) e Gama (γ) como faixas separadas após a coloração do gel. A mudança na densidade dessas bandas após a incubação do veneno com o fibrinogênio pode indicar a presença de enzimas proteolíticas nos venenos, sendo que a maioria das enzimas com ação fibrinogenolítica degradam preferencialmente a subunidade α , seguida por β , como já foi visto para venenos de serpente por Markland, (1998), para a *Loxosceles laeta* por Medina-Santos *et al.* (2019), Barbaro *et al.* (2005) e Grashof *et al.* (2020) e para a *Loxosceles reclusa* de Oklahoma nos Estados Unidos da América e de Tamaulipas no México por Grashof *et al.* (2020). Quando uma determinada amostra tem atividade de degradação de fibrinogênio, as bandas das diferentes subunidades do fibrinogênio poderão ser menos intensas ou desaparecerão por completo, quando analisadas em SDS-PAGE sob condições de redução. A figura 14 mostra a degradação da subunidade α e β do fibrinogênio pelos venenos da *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata* fêmea e macho, após 16 h de incubação. Assim, podemos inferir que o veneno das fêmeas possui maior

concentração de enzimas proteolíticas, já que foi capaz de degradar, ainda que não completamente, as três cadeias do fibrinogênio em porcentagens decrescentes, ao contrário do veneno dos machos que degradaram principalmente a banda α .

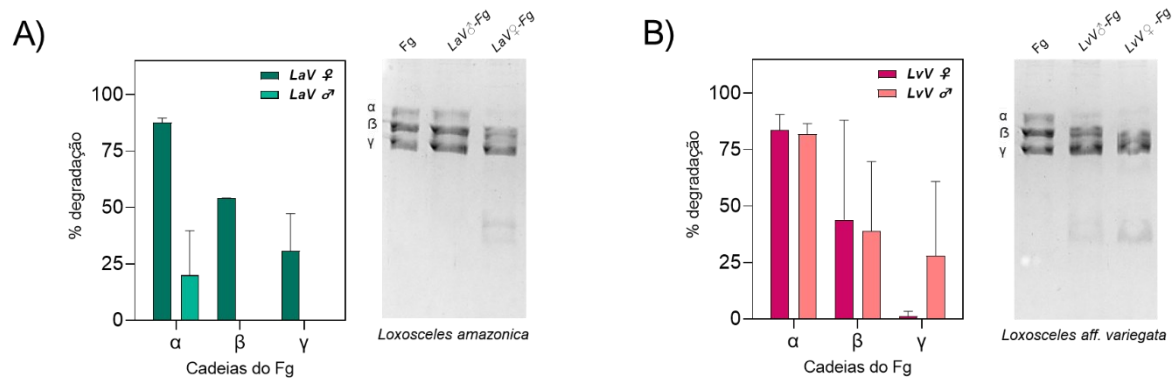


Figura 14: Atividade fibrinogenolítica de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. A atividade proteolítica foi determinada por um ensaio de digestão de fibrinogênio (Fg) descrito por Medina-Santos *et al.*, 2019. A atividade fibrinogenolítica foi realizada utilizando 3 μ g de veneno de *L. amazonica* (LaV) e *L. aff. variegata* (LvV), incubado com fibrinogênio bovino por 16h a 37°C. Após a desnaturalização das amostras de fibrinogênio, puro ou pré-incubado com os venenos, foram analisadas por 12% SDS-PAGE. (A) À esquerda, o gráfico mostra a porcentagem de degradação das cadeias de fibrinogênio. À direita, o SDS-PAGE 12% mostra a atividade fibrinogenolítica do veneno de *L. amazonica* macho e fêmea. (B) À esquerda, o gráfico mostra a porcentagem de degradação das cadeias de fibrinogênio. À direita, o SDS-PAGE a 12% exibe a atividade fibrinogenolítica do veneno de *L. aff. variegata* macho e fêmea. O gráfico foi plotado com a média e desvio padrão do percentual de densidade das bandas em comparação ao controle de fibrinogênio, considerado como 100%, analisado no ImageJ.

4.2. Ensaios *in vivo*

4.2.1. Dermonecrose

A dermonecrose induzida pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles* é amplamente estudada devido à gravidade das lesões cutâneas que pode causar. Diversos estudos comprovaram a conexão da fosfolipase D com o processo de dermonecrose no loxoscelismo cutâneo, utilizando fosfolipases recombinantes de *Loxosceles intermedia* e comparando com a ação do veneno bruto (APPEL *et al.*, 2008; BERTONI DA SILVEIRA *et al.*, 2006; CHAIM *et al.*, 2011a; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; FELICORI *et al.*, 2006). Como a principal ação dos venenos da aranha *Loxosceles* é o desenvolvimento de lesões necróticas em suas vítimas (DA SILVA *et al.*, 2004), estudamos a capacidade do veneno de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* de induzir dermonecrose em coelhos, utilizando 10 µg/kg de veneno bruto.

A avaliação macroscópica realizada diariamente, com o objetivo de monitoramento, permitiu um acompanhamento sistemático da evolução da ferida dermonecrótica e das diferenças entre os grupos de veneno. A dose de veneno tanto de *L. amazonica* quanto de *L. aff. variegata* administrada induziu uma típica lesão que se iniciou com a formação de um halo hemorrágico quatro horas após, associado à prostração, edema, formação da placa marmórea e dor moderada, variáveis em tamanhos conforme o indivíduo (Figura 15). É importante ressaltar mesmo não ocorrendo a medição do edema e do halo hemorrágico, o grupo de *L. aff. variegata* apresentou maior edema e halo hemorrágico quanto comparado ao de *L. amazonica*. Após 48 horas verificou-se que a área hemorrágica se degradou em uma área central de necrose azulada (Figura 15), dando lugar a formação de uma crosta sete dias após a inoculação do veneno (Figura 15), com fechamento parcial da ferida após 17 dias e fechamento completo da ferida observado no 30º dia (dados não mostrados). Essas fases constituem a evolução da ferida dermonecrótica no loxoscelismo observada tanto em humanos como em alguns modelos animais (Ferrara *et al.*, 2009; Pauli *et al.*, 2009).

No estudo de Silvestre *et al.*, (2005), foi demonstrado que o veneno de *L. similis* foi capaz de produzir lesões dermonecróticas perceptíveis, com o desenvolvimento de

uma lesão loxoscélica típica após 24 horas da injeção. Quando comparado com *L. intermedia*, observou-se o mesmo padrão de lesão e potência semelhante. Comparando com outras espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*: 1.00 cm² -10 µg; *L. gaucha*: 1.20 cm²-3 µg; *L. laeta*: 0.50 cm²-10 µg; *L. similis*: 1.00 cm²-10 µg), a lesão foi semelhante, mas a comparação direta é limitada, pois a dose exata relativa ao peso dos coelhos não foi especificada nos estudos.

Devido à limitação da quantidade de veneno disponível, não foi possível realizar o ensaio de dose mínima necrosante (DMN), que é uma medida importante para determinar a quantidade de veneno necessária para causar uma lesão de 1 cm². Esse parâmetro é essencial para permitir a comparação entre diferentes venenos em ensaios distintos. Apesar dessa limitação, a quantidade de veneno utilizada nos experimentos de dermonecrose foi 10 µg/kg que gerou lesões maiores do que 1 cm². No entanto, essas lesões foram compatíveis com a quantidade de proteína que poderia ser injetada por uma única aranha, o que sugere que os resultados obtidos ainda refletem o potencial tóxico real dos venenos estudados.

Ao contrário de ratos e camundongos, que não desenvolvem feridas dermonecroticas, os coelhos são considerados o melhor modelo experimental para o estudo do loxoscelismo cutâneo (DA SILVA *et al.*, 2004). No entanto, observou-se que a evolução das feridas nos coelhos é mais rápida do que nos humanos (DA SILVA *et al.*, 2004; MALAQUE *et al.*, 2002; TAMBOURGI; GONÇALVES-DE-ANDRADE; VAN DEN BERG, 2010). Estudos clínicos e epidemiológicos em humanos indicam que 86,9% e 96,4% dos pacientes internados em hospitais de Santa Catarina e São Paulo, respectivamente, apresentaram a forma cutânea da doença (MALAQUE *et al.*, 2002; SEZERINO *et al.*, 1998).

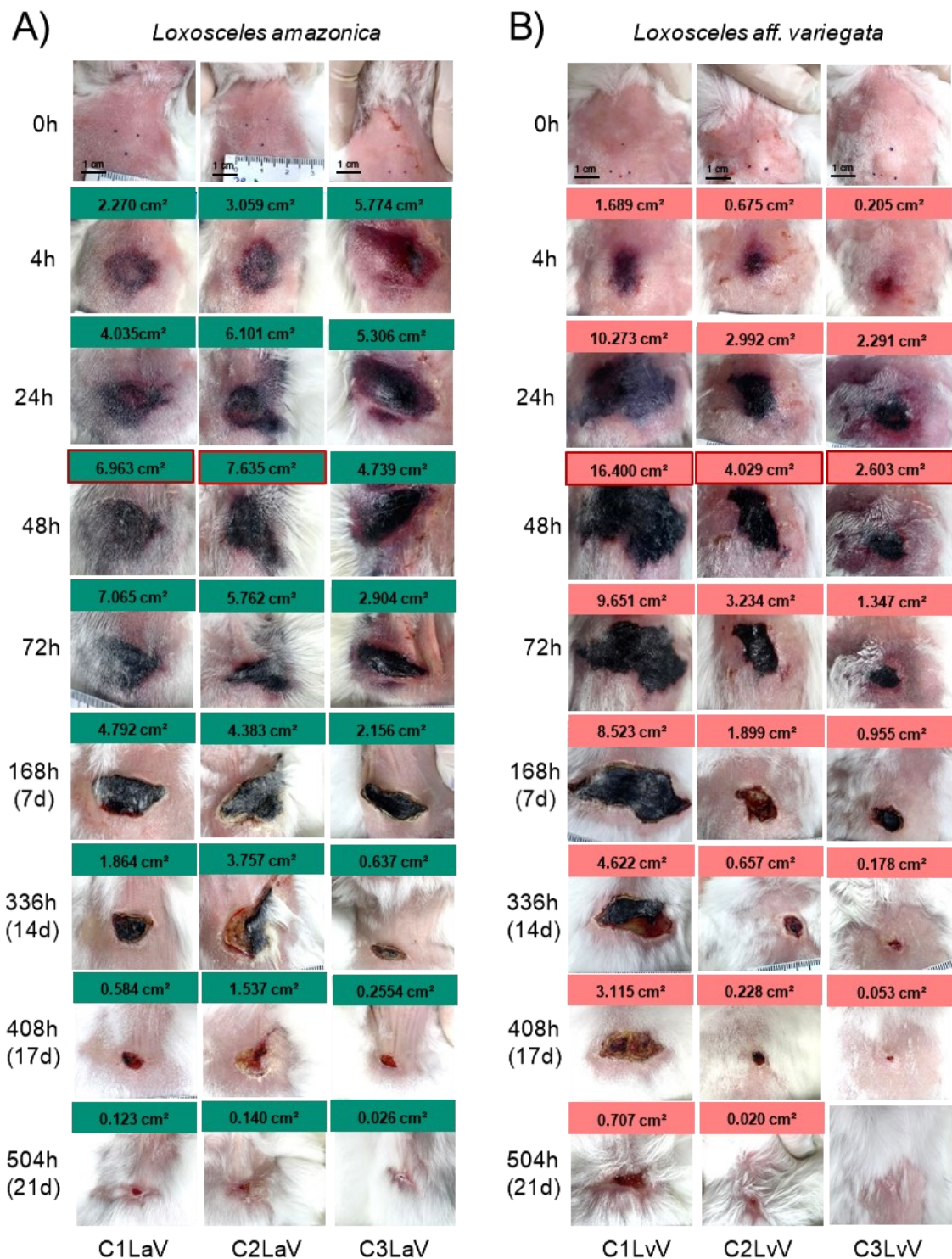


Figura 15: Evolução da lesão dermonecrótica em coelhas inoculadas com 10 µg/kg de veneno de *Loxosceles amazonica* (A) e *Loxosceles aff. variegata* (B) ao longo de 0 a 504 horas, com as áreas da lesão (em cm²) representadas nos retângulos rosas. O pico da lesão, observado em 48 horas, está destacado com uma borda vermelha.

4.2.2. Hemograma

O hemograma é um exame crucial no acompanhamento do loxoscelismo, pois permite monitorar possíveis complicações, como hemólise, anemia e alterações na coagulação sanguínea, que são comuns em casos de envenenamento pela picada da aranha-marrom. A tabela 2 resume os valores de referência para coelhos dos parâmetros elencados para discussão neste trabalho.

Tabela 2: Valores de referências do hemograma e índices hematimétricos, leucograma e plaquetograma.

Hemograma e índices hematimétricos			
Referências :	Hemacounter	Campbell <i>et al.</i> (2012)	Fisher e Graham (2018)
Hemácias totais ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,0 – 7,6	5,2 – 6,8	4,0 – 8,0
Hemoglobina (g/dL)	5,2 – 13,5	11,5 – 15,1	8,0 – 17,5
Hematócrito (%)	31,0 – 46,0	-	30,0 – 50,0
CHCM (g/dL)	32,0 – 37,0	-	29,0 – 37,0
HCM (pg)	20,1 – 25,1	21,1 – 24,5	-
VCM (fL)	56,8 – 66,5	64,6 – 76,2	58,0 – 75,0
RDW-SD (fL)	35,0 – 56,0		
Leucograma			
Referências :	Hemacounter	Campbell <i>et al.</i> (2012)	Fisher e Graham (2018)
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5,2 – 13,5	6,3 – 10,06	5 – 12
Linfócitos absolutos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,2 – 9,00	3,36 – 7,00	-
Granulócitos absolutos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2 – 7,5	-	-
Monócitos absolutos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1 – 0,6	0,05 – 0,45	0,1 – 1,2
Plaquetograma			
Referências :	Hemacounter	Fisher e Graham (2018)	
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	100 – 712	290 – 650	
VCM (fL)	10 – 18	-	
Plaquetócrito (%)	0,1 – 0,5	-	

Na avaliação dos exames laboratoriais, após o envenenamento experimental de coelhos, foi possível observar alterações sanguíneas em todos os indivíduos, para os dois venenos. No hemograma, foram observadas variações no número de hemácias totais (Figura 16A), de hemoglobina (Figura 16B) e hematócrito (Figura 16C). Os índices hematimétricos são parâmetros essenciais para avaliar o tamanho e a coloração das hemácias, desempenhando um papel crucial na identificação e classificação das anemias. Os índices analisados foram: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (Figura 17A), Hemoglobina Corpuscular Média (Figura 17B), Volume Corpuscular Médio (Figura 17C) e RDW-SD (Figura 17D).

A determinação desses parâmetros é muito importante para a avaliação do estado geral de saúde dos animais, especialmente se ocorreu anemia ou policitemia. O número de hemácias, hemoglobina e hematócrito em coelhos varia entre $5,0$ a $7,6 \times 10^6 / \mu\text{L}$ de sangue, $5,2$ a $13,5$ g/dL e $31,0 - 46,0$ %, respectivamente (Hemacounter 60). Na avaliação do hemograma, o número de hemácias (Figura 16A), apresentaram variação pequena na média dos coelhos dentro do grupo do mesmo veneno, porém fora dos valores de referência do equipamento *hemocounter 60* para coelhos, sendo que o intervalo para a *L. aff. variegata* foi $3,69$ a $4,33 \times 10^6 / \mu\text{L}$ e para *L. amazonica* foi $3,94$ a $4,61 \times 10^6 / \mu\text{L}$. Contudo, salienta-se que esses índices em quase todos os tempos se mantiveram dentro do intervalo de referência para a espécie cunícula, e essas alterações não possuem significado clínico quando utilizados os valores de referência de hemácias totais $4,0 - 8,0 \times 10^6 / \mu\text{L}$, descrito por Fisher e Graham (2018). Cabe ressaltar, que nos tempos 4h e 72h houve queda das hemácias com diferença significativa para o grupo de *L. amazonica*.

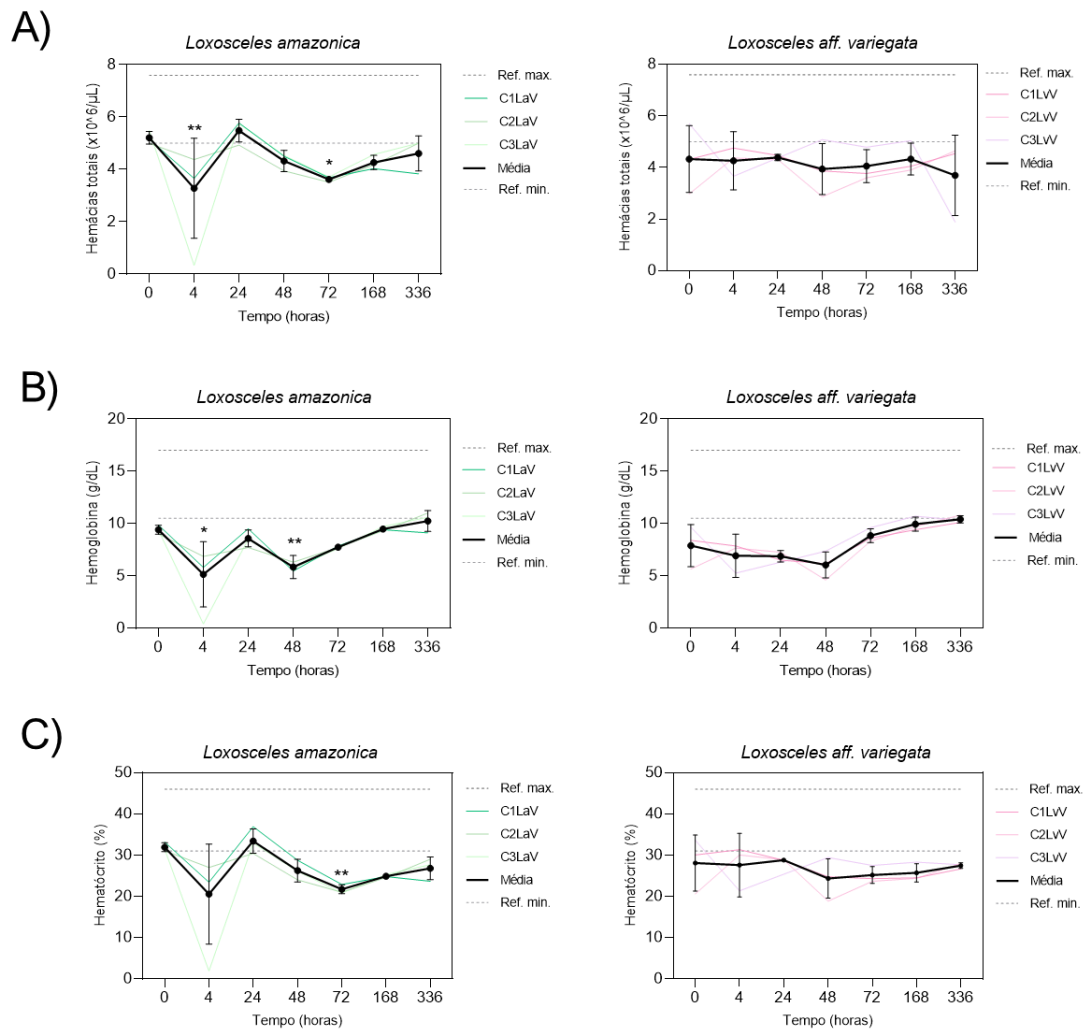


Figura 16: Hemograma dos animais envenenados. Valores $\pm$ desvio padrão da contagem de hemácias totais (A), hemoglobina (B) e hematócrito (C) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Hemácias totais: $5,0 - 7,6 \times 10^6/\mu\text{L}$; Hemoglobina: $5,2 - 13,5 \text{ g/dL}$; Hematócrito: $31,0 - 46,0 \%$. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referencia máxima. Ref. mini – Referencia mínima.

Em relação à concentração de hemoglobina (Figura 16B), o grupo de *L. aff. variegata* apresentou uma queda até 48 horas, seguida de normalização em 336 horas. Por outro lado, o grupo de *L. amazonica* exibiu um padrão distinto, com uma queda inicial em 4 horas e outra em 48 horas, ambas com diferença significativa, também retornando à normalidade em 336 horas. No hematócrito (Figura 16C), o grupo de *L. aff. variegata* não apresentou grande variação nos valores em decorrer do tempo, já para o grupo de *L. amazonica* exibiu um padrão semelhante ao da concentração de hemoglobina, porém com queda até 72h que apresentou diferença significativa em relação aos outros tempos. Ambos os grupos de veneno tiveram os valores fora do intervalo de referência proposto tanto pelo *Hemacounter 60* quanto pelo Fisher e Graham (2018) tanto para a concentração de hemoglobina e para o hematócrito (Tabela 2).

Utilizando o tempo 0 como referência, observa-se uma leve anemia em 48 horas para ambos os venenos, com queda nos níveis de hemácias, hemoglobina e hematócrito nesse período. A redução possivelmente está relacionada à hemorragia local decorrente da aplicação do veneno, ocorrida entre 4 e 48 horas (Figura 15).

Outra alteração importante observada foi a variação nos índices hematimétricos. Para ambos os venenos, a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentaram uma queda até 48 horas, seguida de um aumento até 72 horas, estabilizando-se em valores mais lineares até 336 horas, conforme ilustrado na Figura 17 A e 17B. O Volume Corpuscular Médio (Figura 17C) e o RDW-SD (Figura 17D) não apresentaram alterações significativas em ambos os grupos expostos aos venenos, com as médias permanecendo dentro dos intervalos de referência.

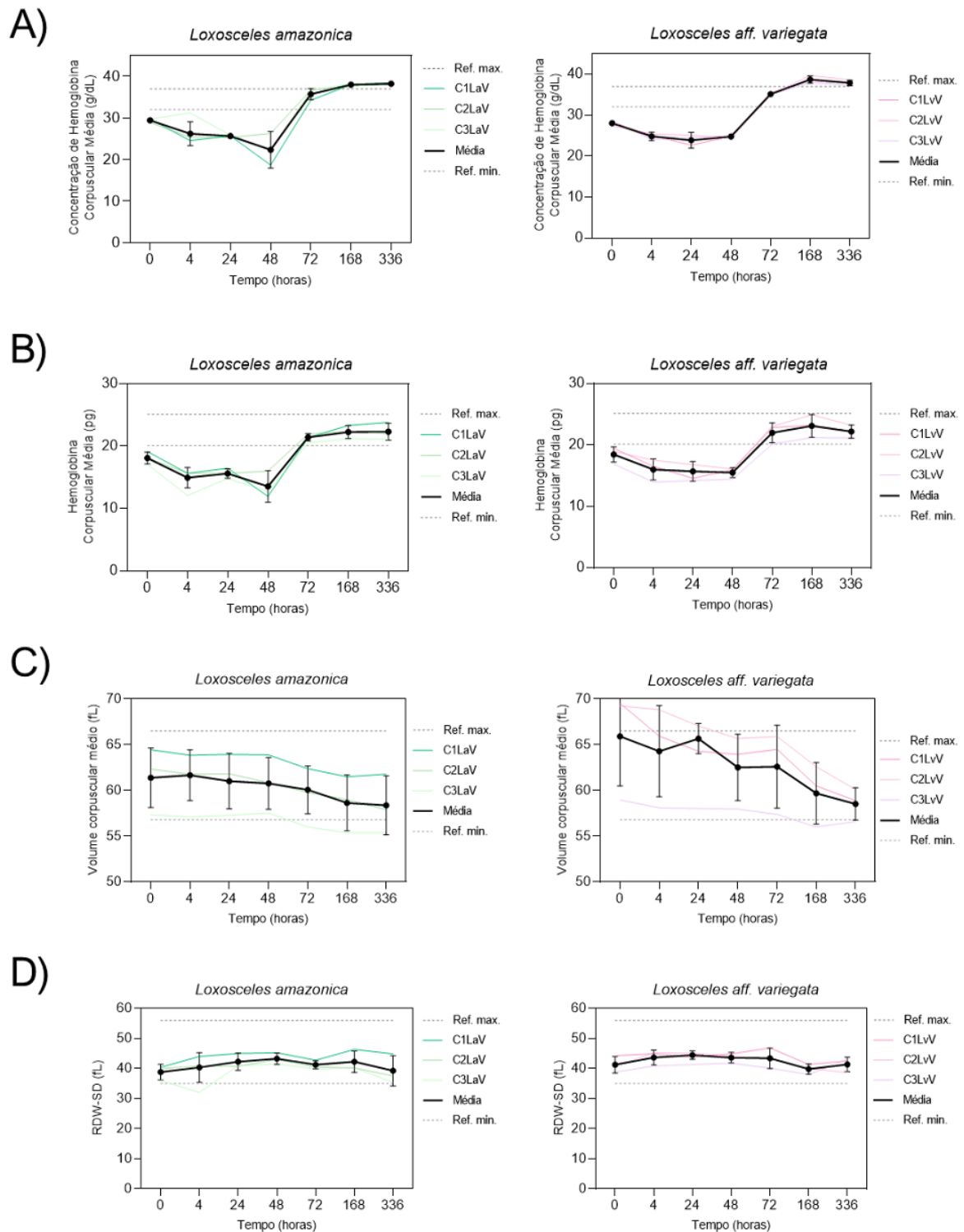


Figura 17: Índices hematimétricos dos animais envenenados. Valores $\pm$ desvio padrão da contagem de Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B), Volume Corpuscular Médio (C) e RDW-SD (D) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de

referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média: 32,0 – 37,0 g/dL; Hemoglobina Corpuscular Média: 20,1 – 25,1 pg; Volume Corpuscular Médio: 56,8 – 66,5 fL, RDW-SD: 35,0 – 56,0 fL. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referencia máxima. Ref. mini – Referencia mínima.

A hemólise eritrocitária foi vinculada ao envenenamento por *Loxosceles* em modelos *in vitro* desenvolvidos por Futrell et al. (1979). Em camundongos, as toxinas também podem induzir hemólise intravascular, liberando citocinas semelhantes às observadas em choques endotóxicos (TAMBOURGI et al., 1998b). O mecanismo que torna o sistema complemento suscetível foi posteriormente elucidado por Tambourgi et al. (2000, 2002), demonstrando que as toxinas são capazes de ativar uma via imunológica alternativa nos eritrócitos humanos, promovendo a ativação de metaloproteinases endógenas. Esse processo resulta na remoção de glicoforinas das membranas, o que possivelmente altera a assimetria da membrana dos eritrócitos. No entanto, estudos anteriores em coelhos e cobaias não detectaram reações hemolíticas. A variação de resposta entre espécies pode estar relacionada às diferenças na composição e organização das estruturas das membranas (Barreto et al., 2007).

Os resultados mostraram que os venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* possuem atividade hemolítica direta sobre eritrócitos humanos, mesmo sem a participação do sistema complemento. Em contrapartida, a avaliação do hemograma dos coelhos revelou variações pequenas no número de hemácias, com valores fora da referência do equipamento Hemocounter 60, mas dentro dos parâmetros normais para a espécie. O grupo de *L. aff. variegata* apresentou uma queda inicial na concentração de hemoglobina, seguida de normalização, enquanto *L. amazonica* teve duas quedas distintas antes de retornar à normalidade. O hematócrito para *L. aff. variegata* se manteve estável, ao passo que para *L. amazonica* houve uma variação semelhante à da concentração de hemoglobina. Além disso, ambos os venenos afetaram índices hematimétricos como CHCM e HCM, que caíram inicialmente e se

estabilizaram posteriormente. Já o VCM e RDW-SD não apresentaram alterações significativas. Esses dados indicam que, embora ambos os venenos induzam hemólise direta, as respostas hemáticas diferem entre as espécies.

4.2.3. Leucograma

Na avaliação dos leucócitos no loxoscelismo, diversos fatores podem interferir nos resultados, como o tempo de coleta após o envenenamento, a quantidade de veneno inoculada, e a ativação de mecanismos endógenos. Esses incluem a ativação do sistema complemento, a migração de polimorfonucleares, além da liberação de enzimas proteolíticas e citocinas (DA SILVA *et al.*, 2003; MALAQUE *et al.*, 2011; MCGLASSON *et al.*, 2007).

Os leucócitos totais para os animais envenenados experimentalmente por *L. aff. variegata* apresentaram crescimento até 168h, seguido por uma queda até 336h, com grande variação individual (Figura 18 A, esquerda). Em contraste, para *L. amazonica*, houve pouca variação individual, com uma queda até 24h, seguida de um aumento significativo que atingiu o pico em 72 horas e retornando aos níveis normais em 336h (Figura 18 A, direita). Em estudos anteriores, observou-se uma intensa leucopenia 24 horas após a inoculação do veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho* (Silva *et al.*, 2003; Tavares *et al.*, 2004). Essa leucopenia está associada à neutropenia, devido à intensa migração de neutrófilos para o tecido horas após o envenenamento, resultando em um decréscimo transitório de neutrófilos na circulação sanguínea. Estudos de Mcglasson *et al.*, (2007) Tavares *et al.*, (2004), Martins (2014) também relatam uma leucocitose significativa 72 horas após a inoculação do veneno de *L. gaucho*, *L. reclusa* e *L. laeta*, respectivamente, coincidindo com o padrão observado para a *L. amazonica* (Figura 18A, direita).

No caso dos linfócitos absolutos, ambos os venenos apresentaram um padrão semelhante (Figura 18B), com uma queda significativa até 4h para a *L. amazonica*, seguida por um aumento até 48h, uma pequena queda em 48h, e nova elevação significativa para ambos os venenos até 168h, seguida de declínio até 336h. Os valores absolutos de linfócitos encontravam-se ligeiramente abaixo dos valores de referência para a espécie em ambos os grupos nos tempos testados, assim como os

resultados aos encontrados por Polli (2020), em coelhos. Em estudos anteriores Tavares *et al.*, 2004, observou linfopenia com 3 e 24 horas após a inoculação de veneno de *L. gaucho*, o mesmo padrão que vemos para a *L. amazonica*.

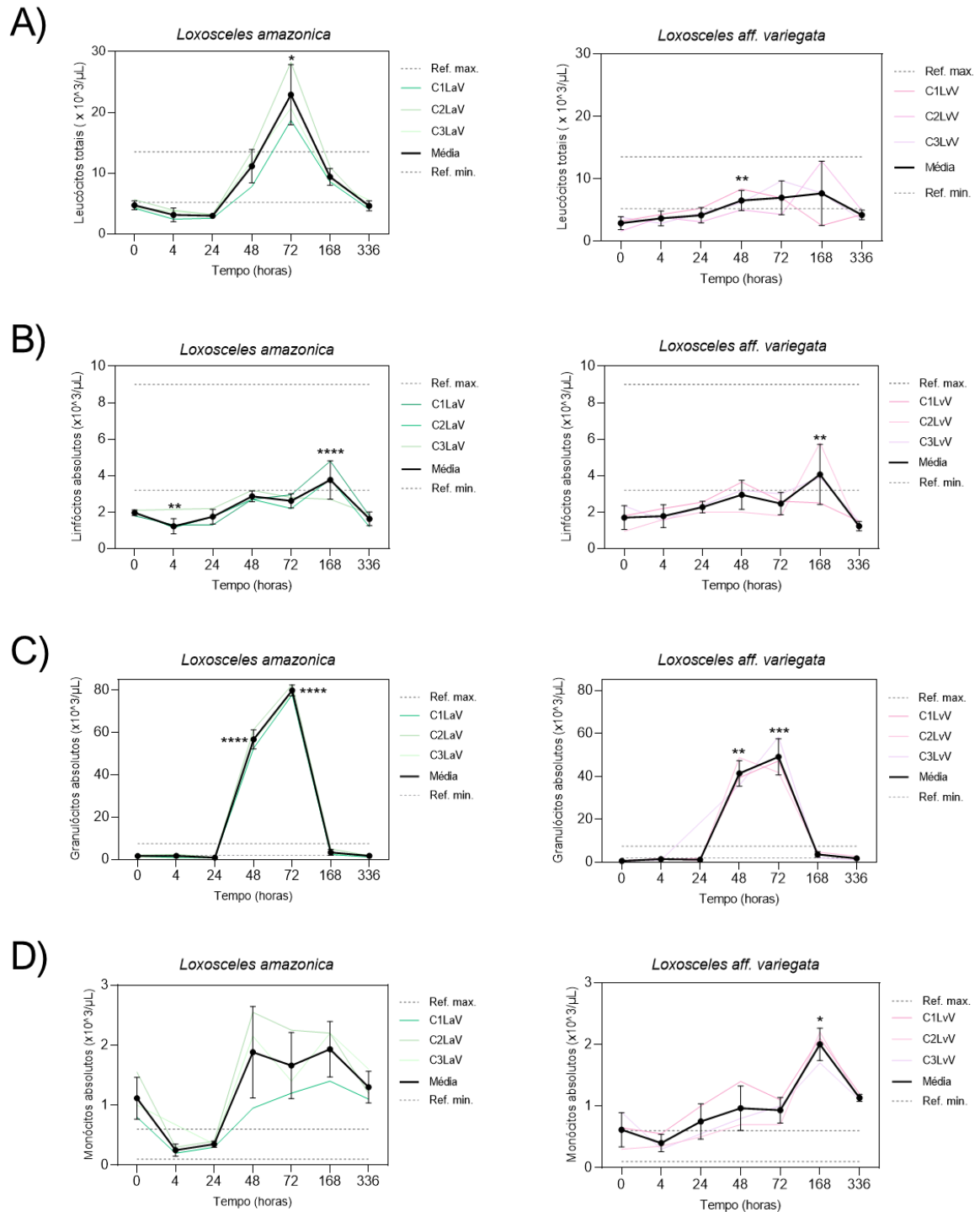


Figura 18: Leucograma dos animais envenenados. Valores $\pm$ desvio padrão da contagem de Leucócitos totais (A), Linfócitos absolutos (B), Granulócitos absolutos (C) e Monócitos

absolutos (D) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Leucócitos totais: $5,2 - 13,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; Linfócitos absolutos: $3,2 - 9,00 \times 10^3/\mu\text{L}$; Granulócitos absolutos: $2 - 7,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; Monócitos absolutos: $0,1 - 0,6 \times 10^3/\mu\text{L}$. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referencia máxima. Ref. mini – Referencia mínima.

Para os granulócitos absolutos, ambos os venenos demonstraram um comportamento similar (Figura 18C), com os níveis estáveis até 24 horas, seguidos por um aumento significativo com picos em 48 horas e 72 horas, e normalização em 336 horas. Como o equipamento não realizava a contagem diferencial de granulócitos, através de revisão da bibliografia pode-se inferir que o aumento visto é caracterizado predominantemente pelos neutrófilos, que são as células envolvidas na resposta inflamatória aguda. As citocinas liberadas migram para a medula óssea, aumentando a taxa de liberação e proliferação de neutrófilos, resultando em um aumento da presença dessas células na corrente sanguínea (THRALL *et al.*, 2017).

No que se refere aos monócitos absolutos, observou-se um padrão distinto entre os venenos (Figura 18D). Para *L. aff. variegata*, houve uma pequena queda até 4h, seguida de um aumento com pico em 168h, sem normalização até 336h após a exposição ao veneno. Já para *L. amazonica*, houve maior variabilidade individual, com queda até 4h, aumento com dois picos em 48h e 168h, e queda subsequente, sem normalização até 336h. Já Tavares *et al.* (2004) observou a presença de monocitose com 72 e 120 horas após a inoculação do veneno de *L. gaucho*, um padrão diferente com a *L. aff. variegata* e a *L. amazonica* que teve em 168h.

4.2.4. Plaquetograma

A avaliação plaquetária é um parâmetro crucial para analisar a hemostasia em indivíduos acometidos pelo loxoscelismo, uma vez que uma das principais complicações do loxoscelismo sistêmico é a coagulação intravascular disseminada (LOPES *et al.*, 2020; ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; MALAQUE *et al.*, 2002). Nos acidentes loxoscélicos a trombocitopenia ocorre de forma precoce nos acidentes por *Loxosceles*, devido a formação de trombos que ocorre no local da picada (Silva *et al.*, 2003). No trabalho de Pauli *et al.*, 2009, nas primeiras 12 horas após o envenenamento foi observado um declínio abrupto na contagem de plaquetas com o reestabelecimento da normalidade após 72 horas, visto também no presente estudo para ambos os venenos (Figura 19A esquerda e direita) o mesmo comportamento, porém em tempos diferentes, mas ainda próximos ao do estudo citado, sendo mais evidente em *L. amazonica* (Figura 19A, direita).

O loxoscelismo cutâneo pode ser agravado em condições de trombocitopenia, visto que as plaquetas têm um papel importante redução de fenômenos hemorrágicos, além dos processos inflamatórios e cicatriciais (Tavares *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2016). No presente estudo, embora tenham sido observadas diferenças, especialmente em relação ao tempo, todas as alterações permaneceram dentro dos valores de referência. Ambos os venenos apresentaram comportamentos semelhantes em todos os parâmetros plaquetários analisados, incluindo o número de plaquetas (19A) e o plaquetócrito (19C), onde houve uma leve redução em 4 horas, seguida por um aumento que começou às 24 horas, atingiu seu pico em 168 horas e apresentou uma queda entre 168 e 336 horas. No volume plaquetário médio (19B), utilizado para avaliar a função e a produção das plaquetas através do tamanho médio das plaquetas, não houve alterações significativas para ambos os venenos.

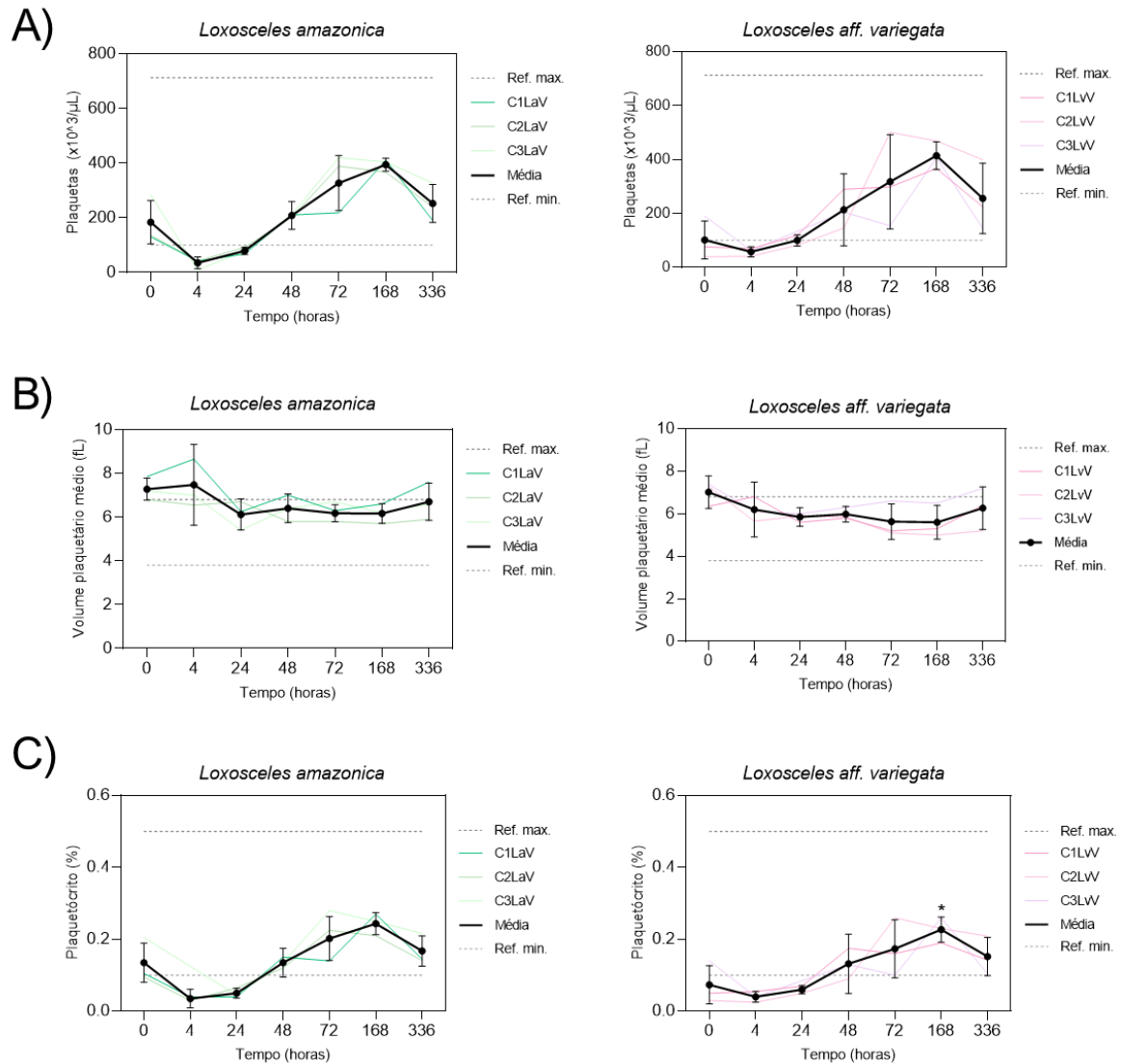


Figura 19: Plaquetograma dos animais envenenados. Valores $\pm$ desvio padrão da contagem de plaquetas (A), Volume plaquetário médio (B) e Plaquetócrito (C) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. *Valores de referência segundo o Hemacounter 60 (Linhas tracejadas): Plaquetas: 100 – 712 $\times 10^3/\mu\text{L}$; Volume plaquetário médio: 10 – 18 fL; Plaquetócrito: 0,1 – 0,5%. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. Ref. max – Referencia máxima. Ref. mini – Referencia mínima.

As plaquetas também demonstraram ter um papel na inflamação, além de também estarem envolvidas em distúrbios trombóticos locais induzida pelo veneno de *Loxosceles*. No trabalho de Tavares *et al.*, (2011), o veneno de *L. gaucho* induziu agregação plaquetária, adesão ao colágeno e aumentou a expressão de ligação induzida por ligante local 1 (LIBS1) e P-selectina, demonstrando o papel central das plaquetas no desenvolvimento da dermonecrose. Por outro lado, outro estudo revelou que as plaquetas desempenham um papel importante na redução da hemorragia, na modulação de processos inflamatórios e na cicatrização. Isso foi evidenciado pelo fato de que coelhos com depleção de plaquetas apresentaram reações mais graves após a aplicação do veneno de *Loxosceles* (TAVARES *et al.*, 2016).

Os dados obtidos no presente estudo destacam a ação diferenciada dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* sobre as plaquetas humanas. O veneno de *L. amazonica* induziu a agregação plaquetária espontânea, comportamento similar ao observado em outras espécies de *Loxosceles*. Por outro lado, o veneno de *L. aff. variegata* não apresentou essa capacidade, mas demonstrou um potencial significativo para inibir a agregação de plaquetas lavadas, especialmente na presença de colágeno. Apesar dessas diferenças, ambos os venenos apresentaram comportamentos semelhantes nos parâmetros plaquetários analisados, com uma leve redução no número de plaquetas e no plaquetócrito inicial, seguida de um aumento que atingiu seu pico e estabilizou posteriormente. No volume plaquetário médio, utilizado para avaliar a função e a produção das plaquetas, não foram observadas alterações significativas em ambos os venenos. Esses resultados sugerem que, embora os mecanismos de ação sobre as plaquetas variem entre as duas espécies, as alterações gerais permanecem dentro dos valores de referência, evidenciando a complexidade dos efeitos dos venenos de *Loxosceles* na hemostasia.

4.2.5. Perfil bioquímico e inflamatório

Para avaliar possíveis danos sistêmicos causados pelos venenos loxoscélicos, foram realizadas análises de índices bioquímicos, ALT, AST, GGT, CK NAC, CK-MB, Ureia e Creatinina K. Esses testes foram realizados na Labtest, utilizando os kits da própria empresa: Amilase CNPG - Ref. 142, Proteínas Totais - Ref. 99, Uréia - Ref.

104, Creatinina K - Ref. 96, CK NAC - Ref. 117, CKMB - Ref. 118, ALT - Ref. 108, AST - Ref. 109 e Gama GT - Ref. 105. Apenas resultados de parâmetros alterados ou de importância para a discussão serão mostrados. As alterações foram destacadas em rosa para *L. aff. variegata* e em verde para *L. amazonica*. Quanto aos índices bioquímicos, além dos citados acima, também foram dosados: amilase e proteínas totais, sendo que nenhum desses parâmetros encontrava-se fora dos valores de referência em nenhum dos tempos avaliados em nenhum animal.

A avaliação bioquímica do soro dos animais inoculados com os venenos de *L. aff. variegata* e *L. amazonica* revelou que os valores médios dos parâmetros ALT e AST estavam elevados em ambos os grupos (Tabela 3). O AST apresentou alteração no período de 24 horas para *L. aff. variegata*, enquanto o ALT mostrou elevações aos 4 e 24 horas para ambos os venenos e às 48 horas para *L. amazonica*, com normalização às 72 horas. Não foram observadas alterações para a GGT em ambos os grupos de veneno.

Tabela 3: Concentrações plasmáticas de (ALT), (AST) E (GGT) de coelhos, 0 horas a 336h após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*.

<i>Loxosceles amazonica</i>									
Tempo	ALT (U/L)			AST (U/L)			GGT (U/L)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
0h	51	70	55	24	20	26	24	20	26
4h	76	100	-	21	22	-	21	22	-
24h	124	70	29	60	28	20	60	28	20
48h	87	57	> 400	33	21	42	33	21	42
72h	53	35	44	14	21	18	14	21	18
168h	67	64	18	18	16	13	18	16	13
336h	75	69	47	21	17	17	21	17	17

<i>Loxosceles aff. variegata</i>									
Tempo	ALT (U/L)			AST (U/L)			GGT (U/L)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
0h	28	68	38	9	20	14	0	4	6
4h	86	54	60	14	13	23	5	0	6
24h	> 400 ****	> 400 ****	-	> 400	7	-	4	0	-
48h	46	54	54	10	17	12	7	6	8
72h	46	43	35	13	14	14	6	5	4
168h	61	64	49	13	15	15	7	7	7
336h	76	82	54	19	21	19	7	7	7

*Valores de referência segundo Fisher e Graham (2018): ALT: 14 – 80 U/L; AST: 14 – 113 U/L. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, **** p < 0.0001.

O aumento nas concentrações plasmáticas de AST é um bom indicador de lesão de hepatócito mais não é específico para lesão hepática, pois essas enzimas são bastante ativas no fígado e podem ser facilmente detectáveis em discretas quantidades. Além disso, essas enzimas também podem estar presentes em outras células, como as musculares e eritrócitos, sendo liberadas devido à lise celular e ao aumento da permeabilidade de membrana (Kaneko, 2008).

Em trabalhos anteriores, foi encontrado que frações de veneno no fígado estão associadas a micro lesões nos hepatócitos e aumento precoce nas enzimas hepáticas (DE OLIVEIRA CHRISTOFF *et al.*, 2008). A observação do aumento dessa enzima em 9% dos pacientes humanos atendidos em um hospital de São Paulo está relacionada a hemólise massiva e ao aumento nos valores de bilirrubina indireta, especialmente nos pacientes diagnosticados com loxoscelismo cutâneo-visceral (MALAQUE *et al.*, 2011).

A creatina quinase é uma enzima presente em todos os tecidos musculares, incluindo o cardíaco. O aumento de seus valores, especialmente da isoenzima MB, é um marcador para diagnóstico e acompanhamento de lesão cardíaca ou infarto do miocárdio (Kaneko *et al.*, 2008). Como não foram encontrados valores de referência para CK e CK-MB em coelhos, considerou-se como alteração leituras acima de 600 U/L para ambos os analitos. As alterações nos marcadores musculares e cardíacos (Tabela 4) foram mais pronunciadas no grupo exposto ao veneno de *L. amazonica*, sendo observadas em 24h, 48h e 72h para CK e em 48h, 72h e 168h para CK-MB. Para *L. aff. variegata*, as alterações foram observadas apenas em 24h para CK. No estudo de Dias-Lopes *et al.*, (2010), observou-se que aumento dessas enzimas em camundongos após a inoculação de veneno de *L. intermedia*, associado à presença de frações do veneno no tecido cardíaco. Aumento isolado de CK, como observado por França *et al.*, (2002) em dois casos, sugere rabdomiólise.

Tabela 4: Concentrações plasmáticas de Creatinofosfoquinase (CK NAC) e Creatinofosfoquinase Fração MB (CKMB) de coelhos, 0 horas a 336h após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

<i>Loxosceles amazonica</i>						
Tempo	CK NAC (U/L)			CKMB (U/L)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
0h	352	335	379	213	332	-
4h	308	564	-	116	146	-
24h	775	1279	1510	224	237	-
48h	1141 *	1203 *	> 2000 *	253	359	> 600
72h	434	1685	882	314	> 600	464
168h	156	192	384	217	261	686
336h	240	232	147	321	278	138

<i>Loxosceles aff. variegata</i>						
Tempo	CK NAC (U/L)			CKMB (U/L)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
0h	99	275	150	94	315	232
4h	94	95	244	110	304	499
24h	> 600	> 600	-	209	184	-
48h	234	176	127	252	534	270
72h	308	362	239	216	285	390
168h	302	124	257	185	203	288
336h	152	89	297	152	289	557

A ureia e a creatinina são analitos testados rotineiramente para avaliar a função excretora dos rins e detectar possíveis insuficiências renais, tanto agudas quanto crônicas. Já foi demonstrado que o veneno da aranha *Loxosceles spp.* pode causar danos diretos aos túbulos e glomérulos renais, levando a edema glomerular e nefrose tubular, resultando em insuficiência renal aguda (CHAIM *et al.*, 2006). Além disso, a hemoglobina plasmática liberada durante a hemólise intravascular no loxoscelismo cutâneo-visceral também pode causar insuficiência renal (TAVARES *et al.*, 2004).

As alterações nos marcadores bioquímicos renais foram observadas apenas no grupo exposto ao veneno de *L. amazonica*, especificamente nos níveis de ureia, que apresentaram elevações nos tempos de 24h, 48h e 72h (Tabela 5). No entanto, essas alterações ocorreram apenas em dois dos três indivíduos do grupo. Esses resultados

sugerem uma possível variabilidade individual na resposta renal ao veneno de *L. amazonica*. A elevação da ureia pode estar associada a um comprometimento temporário da função renal, indicando um efeito nefrotóxico moderado, embora não seja um padrão uniforme entre todos os indivíduos. A ausência de alterações em outros marcadores renais e em todos os indivíduos do grupo limita a generalização desses achados, sugerindo que o impacto renal do veneno pode depender de fatores individuais ou da dose. Essa variabilidade pode ser importante para orientar futuras pesquisas sobre os efeitos renais dos venenos de *Loxosceles*.

Tabela 5: Concentrações plasmáticas de ureia e creatinina de coelhos, 0 horas a 336h após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*. A significância é definida como *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, **** p < 0.0001.

<i>Loxosceles amazonica</i>						
Tempo	Ureia (mg/dL)			Creatinina K (mg/dL)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
0h	20	24	24	0,38	0,51	0,68
4h	27	19	-	0,82	0,8	-
24h	50 ***	92 ***	90 ***	0,97 **	1,11 **	0,86 **
48h	30	57	50	0,85	0,79	0,56
72h	20	31	45	0,69	0,55	0,7
168h	26	20	14	0,87	0,63	0,39
336h	23	20	21	0,64	0,5	0,63

<i>Loxosceles aff. variegata</i>						
Tempo	Ureia (mg/dL)			Creatinina K (mg/dL)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
0h	17	24	22	0,34	0,45	0,58
4h	25	26	26	0,67	0,68	0,76
24h	32	24	-	0,24	0,21	-
48h	25	29	21	0,68	0,77	0,74
72h	23	14	22	0,68	0,65	0,69
168h	16	16	31	0,59	0,72	0,72
336h	25	23	33	0,7	0,67	0,83

*Valores de referência segundo Fisher e Graham (2018): Ureia: 15 – 50 U/L; Creatinina: 0,5 – 2,6 mg/dL.

A reação inflamatória no loxoscelismo envolve mediadores fundamentais na quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Estudos indicam que as fosfolipases D no veneno de *Loxosceles* causam necrose cutânea e liberam mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que recrutam e ativam neutrófilos (GREMSKI et al., 2014; MACHADO et al., 2005). Mediadores como IL-8, IL-6 e TNF- α ampliam a inflamação, agravando a lesão tecidual e os sintomas clínicos (BARBARO et al., 2010; DRAGULEV et al., 2007). Devido a isso, realizamos a determinação das concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-8 séricas do sangue dos coelhos envenenados.

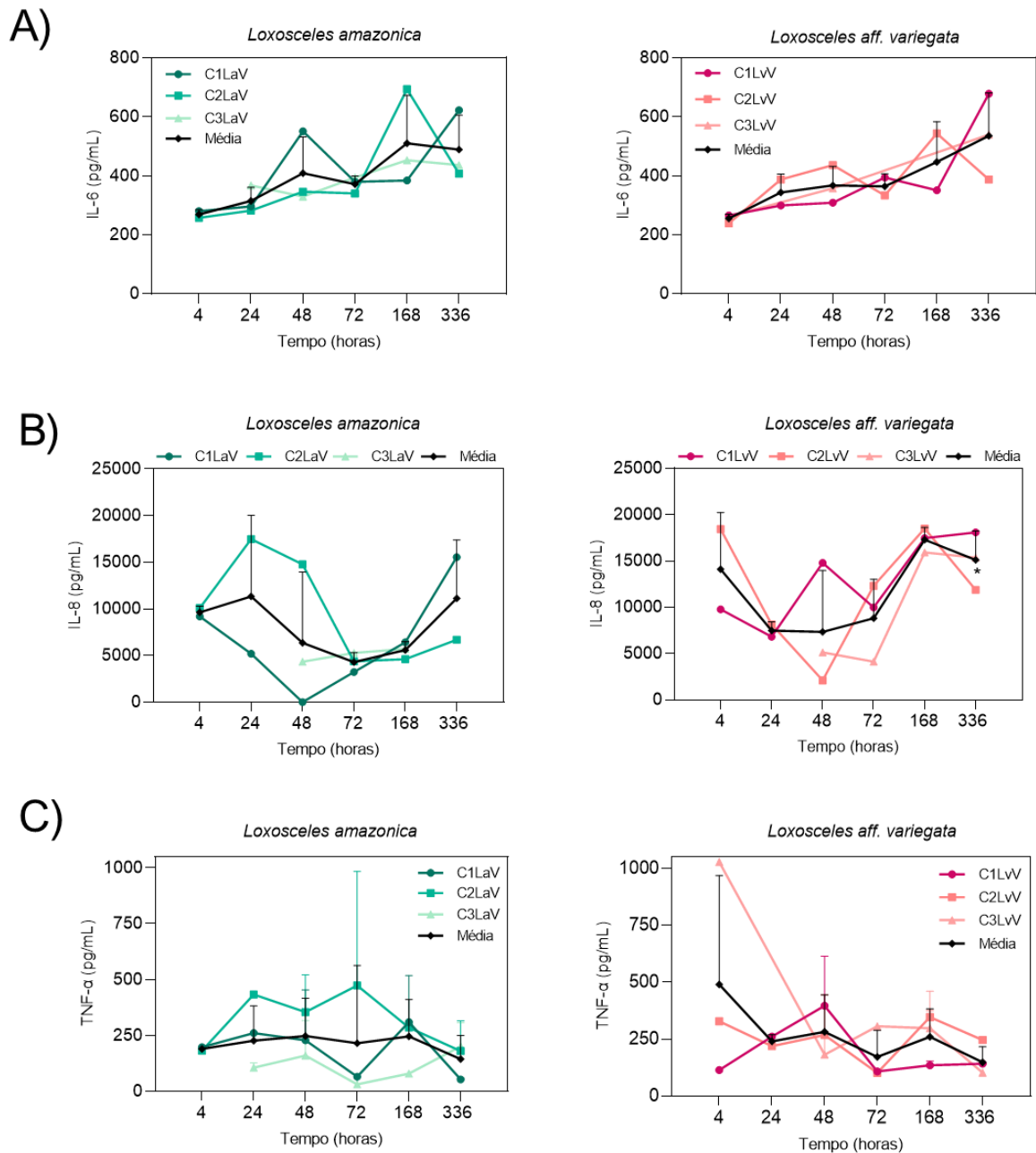


Figura 20: Análise dos níveis séricos de IL-6 (A) IL-8 (B) e TNF- α (C) de coelhos injetados com veneno de *L. amazonica* e *L. aff. variegata*. C1LvV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C2LvV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C3LvV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles aff. variegata*. C1LaV - Coelho 1 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C2LaV - Coelho 2 do grupo de *Loxosceles amazonica*. C3LaV - Coelho 3 do grupo de *Loxosceles amazonica*. A significância é definida como * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Ambos os venenos estimularam a secreção de citocina pró-inflamatória. Os níveis de IL-6 aumentaram de 4 h até 336 h após a injeção de ambos os venenos (Figura 20A). Nenhuma diferença foi observada nos níveis de IL-8 e TNF- α entre os grupos experimental e intervalos de tempo testados (Figura 20B e 20C).

Além do recrutamento de células inflamatórias, nossos resultados sugeriram que mediadores pró-inflamatórios (IL-6, IL-8 e TNF- α) poderiam participar do desenvolvimento da lesão tecidual no envenenamento por *L. amazonica* e *L. aff. variegata*. No entanto, nenhum aumento foi observado na produção de IL-8 e TNF- α . Os mediadores pró-inflamatórios são os principais responsáveis por iniciar uma resposta imune eficaz contra toxinas e patógenos, mas a superprodução desses mediadores contribui para choque, falência de múltiplos órgãos e morte (VAN DER MEIDE E SCHELLEKENS, 1996). Várias citocinas estão envolvidas em envenenamento grave, por exemplo, TNF- α , IL-1 β e IL-6. O TNF- α foi relatado como um mediador crucial na patogênese de vários envenenamentos (PETRICEVICH, 2004). A origem da secreção de IL-6 induzida pelo veneno de *L. gaucho* no local inflamatório ainda não foi esclarecida (BARBARO *et al.*, 2010).

4.2.6. Dose Letal 50 (DL₅₀)

Para verificar o potencial letal dos venenos estudados, foi realizado o ensaio de DL₅₀. Três ensaios exploratórios foram conduzidos para definir o intervalo de doses. No 1º ensaio, inoculamos 12 μ g (DL₅₀ média para *Loxosceles*) dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* em camundongos, e nenhum morreu. No 2º ensaio, inoculamos 36 μ g (3 DL₅₀ média para *Loxosceles*) dos venenos, resultando na morte de 1 camundongo inoculados com o veneno de *L. aff. variegata* e todos inoculados com o veneno de *L. amazonica*. No 3º ensaio, inoculamos 50 μ g do veneno de *L. aff. variegata* em 3 camundongos e 36 μ g do veneno de *L. amazonica* em 2 camundongos, além de um controle com BSA 0,1%. Morreram 2 camundongos com *L. aff. variegata* e 2 com *L. amazonica*. O controle foi para testar se a solução de BSA 0,1% teria influência na análise de presença ou ausência de albumina na urina devido a uma lesão renal aguda provocada pelo envenenamento por *Loxosceles*. Com esse teste vimos que há uma excreção extremamente pequena de albumina devido a presença

de BSA na solução de veneno na hora da inoculação, assim decidimos continuar a utilizar a solução de BSA para inocular os venenos nos experimentos de DL50.

A Dose letal de e *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata* foi realizada em camundongos submetidos à injeção subcutânea dos venenos loxoscélicos. Observamos na tabela 1 que ambos os venenos são letais para camundongos, mas e *Loxosceles aff. variegata* foi mais letal que *Loxosceles amazonica*, apresentando uma DL₅₀ menor (DL₅₀ = 1,72 mg/kg e 1,81 mg/kg, respectivamente).

Tabela 6: Concentrações de Dose Letal 50 (DL50) definidas para os venenos de *Loxosceles amazonica* e *Loxosceles aff. variegata*.

Grupos por veneno	Mortes por grupo		% de morte	DL50 (mg/kg)
<i>Loxosceles aff. variegata</i>	24h	48h		
Grupo 1: 30,6 µg	1/4	1/4	25	
Grupo 2: 34,0 µg	2/4	2/4	50	
Grupo 3: 42,8 µg	1/4	1/4	25	1,72
Grupo 4: 47,5 µg	3/4	4/4	100	
Grupo 5: 60 µg	3/4	3/4	75	
<i>Loxosceles amazonica</i>	24h	48h		
Grupo 1: 10 µg	0/5	0/5	0	
Grupo 2: 14 µg	0/5	0/5	0	
Grupo 3: 19,6µg	0/5	0/5	0	
Grupo 4: 27,4 µg	1/5	1/5	20	1,81
Grupo 5: 38,4 µg	2/5	2/5	40	
Grupo 6: 53,78 µg	4/5	4/5	80	

Estudos anteriores realizaram a determinação da DL₅₀ com o veneno total de cinco espécies brasileiras de *Loxosceles*, onde foi demonstrado que o veneno da *Loxosceles similis* foi o mais letal em camundongos com uma DL₅₀ = 0,32 mg/kg (SILVESTRE *et al.*, 2005), seguido pela *L. intermedia* com DL₅₀ de 0,48 mg/kg e 0,5 mg/kg, encontrados por Bárbaro *et al.*, (1996) e Braz *et al.*, (1999), respectivamente. Para o veneno de *L. gaucho*, foram encontrados em estudos distintos, 0,74 mg/kg e 0,574 mg/kg por Bárbaro *et al.*, (1996) e Pretel *et al.*, (2005), respectivamente. E para

a *L. laeta*, veneno foi de 1,45 mg/kg (Bárbaro e outros, 1996) e para o veneno de *Loxosceles adelaida* 0,696 mg/kg (PRETEL *et al.*, 2005).

Os resultados aqui obtidos para os venenos de *L. amazonica* (1,81 mg/kg) e *L. aff. variegata* (1,72 mg/kg) são superiores aos reportados para outras espécies de *Loxosceles*. Esses valores, embora mais altos, ainda estão dentro da mesma ordem de grandeza, o que sugere que os venenos dessas duas espécies são efetivamente letais, mas talvez menos potentes em comparação com outras espécies.

O modelo de camundongo e ratos são amplamente utilizado na pesquisa científica devido à sua facilidade de manejo e reprodutibilidade dos resultados, representando cerca de 90% dos animais utilizados na pesquisa científica. Esses animais, compartilham várias semelhanças com os humanos, incluindo sistemas orgânicos, mecanismos de regulação e áreas cerebrais, além da similaridade genética. No entanto, a extrapolação direta desses dados para a clínica humana deve ser feita com cautela, pois a resposta fisiológica pode variar entre espécies. Os valores de DL50 fornecem uma referência importante para avaliar a toxicidade relativa, mas os efeitos clínicos em humanos podem ser influenciados por vários fatores, como a via de exposição e o estado de saúde do indivíduo (DUARTE, 2022).

Os valores obtidos indicam que os venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* possuem um potencial significativo para causar danos, mas a relevância clínica desses valores depende de mais estudos que incluam outros modelos animais e análises clínicas detalhadas.

4.2.7. Avaliação de danos renais

A urina dos animais utilizados no ensaio de DL50 foi analisada usando tiras reagentes. Este ensaio atuou como uma triagem inicial, conduzida com os animais da DL50, e indicou a presença de alterações renais. Com base nesses resultados preliminares, desenhamos um experimento subsequente, ajustando a dose para garantir que os animais pudessem ser acompanhados ao longo do estudo sem que houvesse mortalidade.

Nesta análise, foi possível constatar uma grande presença de proteínas na urina de todos os animais (500 mg/dL), embora não em todos os tempos (TABELA 7). Um aumento de proteínas na urina dos animais inoculados com *L. amazonica* foi observado em comparação aos inoculados com *L. aff. variegata*. Também foi avaliada a presença de sangue e leucócitos na urina, sendo maiores nos animais inoculados com *L. amazonica* (5h e 24h para sangue e leucócitos) e menores nos animais inoculados com *L. aff. variegata* (5h para sangue; 48h e 72h para leucócitos).

Tabela 7: Determinação semiquantitativa de proteína, sangue e leucócitos nas urinas de camundongos para avaliação de dano renal.

<i>Loxosceles amazonica</i>					
Dose	Proteína (mg/dL)				
	0h	5h	24h	48h	72h
10 µg	100	500	500	500	100
14 µg	30	500	500	500	-
19,6µg	30	500	500	500	500
27,4 µg	traço	500	traço	neg	traço
38,4 µg	traço	500	500	500	500
53,78 µg	30	500	30	30	30
Dose	Sangue (sangue/hemoglobina RBC/µL)				
	0h	5h	24h	48h	72h
10 µg	neg	neg	+ca. 5-10	neg	-
14 µg	neg	+ca. 5-10	+ca. 5-10	+ca. 5-10	-
19,6µg	neg	+ca. 5-10	++ca. 50	+ca. 5-10	neg
27,4 µg	neg	+ca. 5-10	neg	-	neg
38,4 µg	neg	++ca. 50	+ca. 5-10	+ca. 5-10	neg
53,78 µg	neg	+ca. 5-10	neg	neg	neg
Dose	Leucócitos (leucócito/µL)				
	0h	5h	24h	48h	72h
10 µg	neg	25	500	500	25
14 µg	25	500	500	-	-
19,6µg	25	500	500	500	500
27,4 µg	neg	500	neg	-	neg
38,4 µg	neg	500	500	-	500
53,78 µg	neg	500	neg	neg	neg

<i>Loxosceles aff. variegata</i>					
Dose	Proteína (mg/dL)				
	0h	5h	24h	48h	72h
30,6 µg	traço	500	30	traço	traço
34,0 µg	traço	100	neg	500	100
42,8 µg	traço	100	500	500	500
47,5 µg	traço	100	500	-	-
60 µg	100	500	traço	traço	100
Dose	Sangue (sangue/hemoglobina RBC/µL)				
	0h	5h	24h	48h	72h
30,6 µg	norm	+ca. 5-10	ca. 300	50	neg
34,0 µg	neg	+ca. 5-10	neg	neg	+ca. 5-10
42,8 µg	neg	+ca. 5-10	neg	neg	+ca. 5-10
47,5 µg	neg	++ca. 50	-	-	-
60 µg	neg	neg	neg	neg	neg
Dose	Leucócitos (leucócito/µL)				
	0h	5h	24h	48h	72h
30,6 µg	neg	75	25	500	neg
34,0 µg	traço	100	neg	500	100
42,8 µg	neg	neg	500	500	500
47,5 µg	neg	75	-	-	-
60 µg	neg	neg	neg	neg	neg

Esses resultados indicam que, embora ambos os venenos causem danos renais, o impacto do veneno de *L. amazonica* é maior em termos de proteinúria e presença de sangue e leucócitos na urina. Esses dados indicam que a proteinúria, um indicador de lesão glomerular, pode estar mais pronunciada em animais expostos ao veneno de *L. amazonica*. A presença de sangue e leucócitos também sugere inflamação e dano tecidual significativo. Segundo Thrall et al. (2017), hemoglobinúria

e mioglobínúria podem causar positividade nas tiras reagentes devido à detecção de ferro, e a presença de bactérias ou contaminação por produtos de limpeza pode gerar falsos positivos. Portanto, esses resultados devem ser correlacionados à sedimentoscopia para verificar a presença de eritrócitos. No entanto, não foi possível realizar a sedimentoscopia devido ao pequeno volume de urina coletado.

Outra relevante anomalia observada foi a presença de grandes concentrações de proteína na urina. Conforme Wesche (2009), a indicação de proteínas na urina por fitas reagentes em roedores e outros herbívoros pode não ser confiável devido à alcalinidade da urina, podendo ocorrer falsos positivos. A proteinúria ocorre quando os glomérulos perdem a capacidade de reter proteínas de cargas negativas, como a albumina, devido à deposição de imunoglobulinas nas membranas basais, polarizando-as positivamente e causando a liberação de proteínas na urina. A presença de proteínas na urina é indicadora de lesão glomerular, precedendo a ocorrência de azotemia (THRALL *et al.*, 2017).

Para analisar os efeitos dos venenos loxoscélicos nos rins, foi realizado o ensaio de avaliação renal, inoculando $\frac{1}{2}$ DL50 dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* nos camundongos por via subcutânea, permitindo um monitoramento detalhado dos animais ao longo do tempo. O primeiro grupo, composto por 13 camundongos tratados com veneno de *L. amazonica*, foi subdividido em três subgrupos: quatro camundongos observados por 6 horas, quatro por 24 horas e cinco por 72 horas. O segundo grupo, com 13 camundongos tratados com veneno de *L. aff. variegata*, seguiu o mesmo esquema de subdivisão de tempos. O terceiro grupo, composto por quatro camundongos, serviu como controle negativo e foi observado por 72 horas. Devido a essa divisão, nas Figuras 21 e 22 haverá 1 camundongo a mais no tempo de 72 horas. Além disso, no tempo de 24 horas da Figura 22, não foi possível obter a urina de um dos camundongos. Antes da eutanásia dos camundongos foram coletadas as urinas dos camundongos por grupo (6, 24 e 72 horas) e após a eutanásia dos animais, foi realizada as necropsias e análises histopatológicas por microscopia óptica dos rins.

No SDS-PAGE, foi observado que para os animais envenenados com a *L. amazonica* após 6 horas, houve pouca excreção de proteína na urina, mas já foi

possível detectar discreta microalbuminúria. Em 24 horas, houve um pico de proteinúria em todos os indivíduos, especialmente com a presença de albumina e outras proteínas com massas moleculares acima e abaixo de 60 kDa, o que indica lesões glomerulares e danos tubulares (LE BRICON *et al.*, 1998; SCHULTZE; JENSEN, 1989). Após 72 horas, a proteinúria foi detectada apenas em dois indivíduos, sugerindo que as lesões renais podem ser reversíveis.

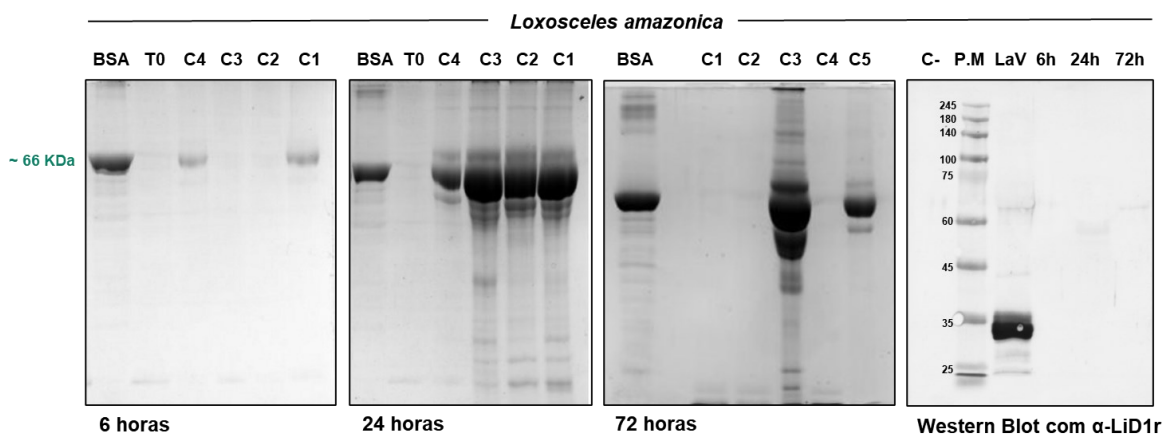


Figura 21: SDS-PAGE e Western Blot das urinas dos camundongos dos grupos de *Loxosceles amazonica*, coletadas em 6h, 24h e 72h. BSA - albumina sérica bovina. T0 - Tempo zero. C1 - Camundongo. 1 C2 - Camundongo 2. C3 - Camundongo 3. C4 - Camundongo 4. C5 - Camundongo 5. C- - Controle negativo. P.M - Peso molecular. LaV: veneno de *Loxosceles amazonica*. α LiD1r - soro de cavalo desenvolvidos contra a toxina dermonecrótica recombinante de *Loxosceles intermedia*.

Em contrapartida, para os animais envenenados com *L. aff. variegata*, em 6 horas também houve pouca excreção de proteína na urina e microalbuminúria. Em 24 horas, houve uma proteinúria considerável no indivíduo C1, especialmente com a presença de albumina e outras proteínas com massas moleculares acima e abaixo de 66 kDa, o que indica lesões glomerulares e danos tubulares (LE BRICON *et al.*, 1998; SCHULTZE; JENSEN, 1989). O pico de proteinúria, diferente do obtido para os animais envenenados com *L. amazonica*, foi mais tardio, sendo após de 72 horas, onde a proteinúria foi detectada em todos os animais, exceto no camundongo 5.

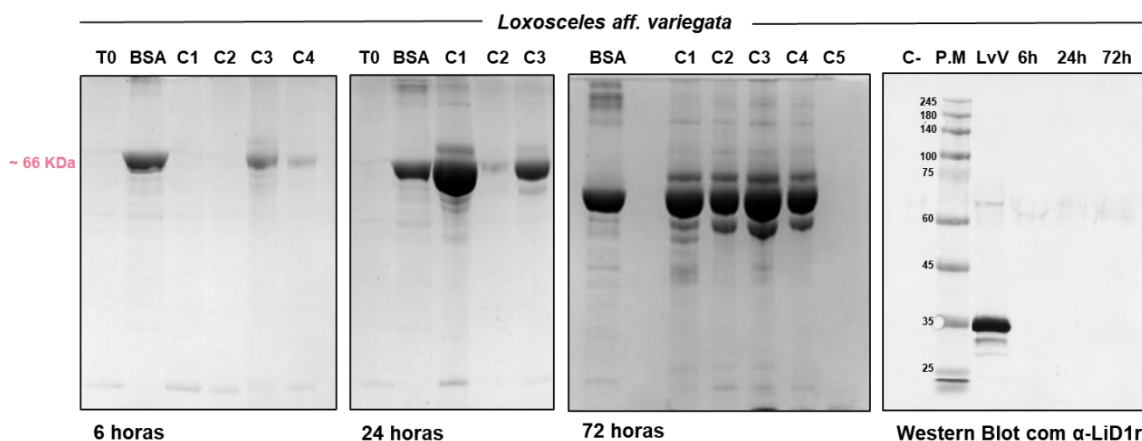


Figura 22: SDS-PAGE e Western Blot dos camundongos dos subgrupos de *Loxosceles aff. variegata*, coletadas 6h, 24h, 72h. BSA - albumina sérica bovina. T0 - Tempo zero. C1 - Camundongo. 1 C2 - Camundongo 2. C3 - Camundongo 3. C4 - Camundongo 4. C5 - Camundongo 5. C- - Controle negativo. P.M - Peso molecular. LaV: veneno de *Loxosceles amazonica*. α LiD1r - soro de cavalo desenvolvidos contra a toxina dermonecrótica recombinante de *Loxosceles intermedia*.

Visando testar a hipótese de que o veneno poderia ser excretado pela urina, realizamos um western blot com soro α LiD1r, uma proteína recombinante de PLD do veneno de *L. intermedia*, que já demonstrou reação cruzada com as PLDs dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata*. A hipótese era embasada na suposição de que o clearance do veneno ocorreria via renal, visto que estudos anteriores mostraram efeitos diretos das PLDs no rim. Contudo, nossos resultados não detectaram a presença de PLDs nos pools de urina analisados nem no controle negativo. É importante considerar que a ausência de detecção pode indicar que o veneno realmente não é excretado pela urina, e não necessariamente uma falha na sensibilidade do teste empregado.

Estudos anteriores demonstraram que há múltiplas causas da insuficiência renal aguda (IRA) no loxoscelismo. Um trabalho relatou dois casos de loxoscelismo viscerocutâneo com rabdomiólise e insuficiência renal aguda no Brasil, onde ambos os pacientes apresentaram edema grave, eritema e dermonecrose, com níveis elevados de creatina quinase. Assim, a rabdomiólise foi identificada como um fator contribuinte para a insuficiência renal, sugerindo que a creatina quinase deve ser

monitorada nesses casos para prevenir danos renais graves (FRANÇA; BARBARO; ABDULKADER, 2002). No estudo de Albuquerque *et al.*, (2018), os pacientes que desenvolveram insuficiência renal aguda (IRA) inicialmente apresentaram febre, eritema e edema generalizado. Apenas um paciente teve mialgia, enquanto dois apresentaram icterícia. Além disso, quatro pacientes desenvolveram rabdomiólise, todos evoluindo para IRA.

No presente estudo, a análise das histologias renais após a inoculação de $\frac{1}{2}$ DL50 dos venenos, revelou alterações em todos os animais do grupo de *Loxosceles amazonica* (figura 22) e *Loxosceles aff. variegata* (figura 23) porém somente lâminas de dois animais de cada grupo foram usadas para representar as alterações renais.

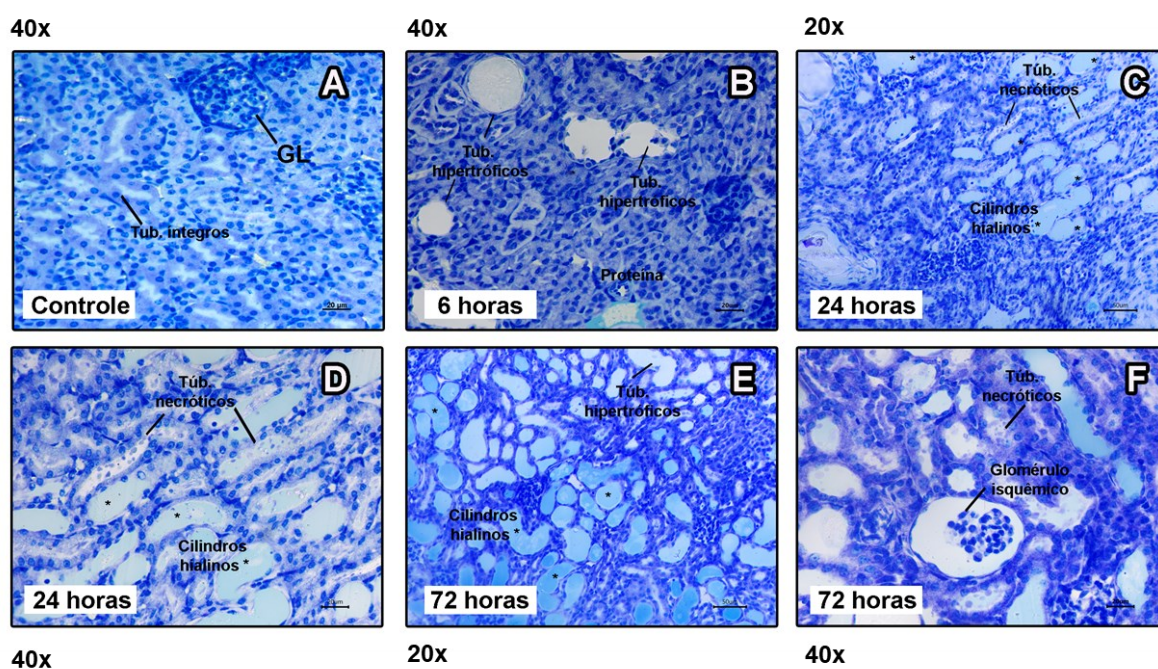


Figura 23: Histologia renal de camundongos inoculados com $\frac{1}{2}$ DL₅₀ de veneno de *Loxosceles amazonica*, após coloração de azul de toluidina. (A) Túbulos e glomérulos renais íntegros. (B) Túbulos hipertróficos e deposição de proteína em túbulos. (C) Túbulos necróticos (setas) e cilindros hialinos (*). (D) Túbulos necróticos (setas). (E) . (F) Túbulos necróticos (setas) e glomérulo isquêmico.

Na análise da microscopia óptica dos rins dos camundongos após a inoculação de veneno de *L. amazonica*, houve a deposição de material eosinofílico amorfo, sugestivo de proteína, e aparecimento de túbulos hipertróficos em 6 horas (figura

22B). Em 24 horas, aparecimento de necrose tubular causada por degeneração vacuolar nos túbulos proximais e distais (figura 22C e 22D). Por último, em 72 horas (figura 22E), há dilatação de túbulos contorcidos proximais e distais devido à deposição de material hialino nessas estruturas, sugestivo de acúmulo proteico, glomérulo isquêmico e túbulos necróticos (figura 22F).

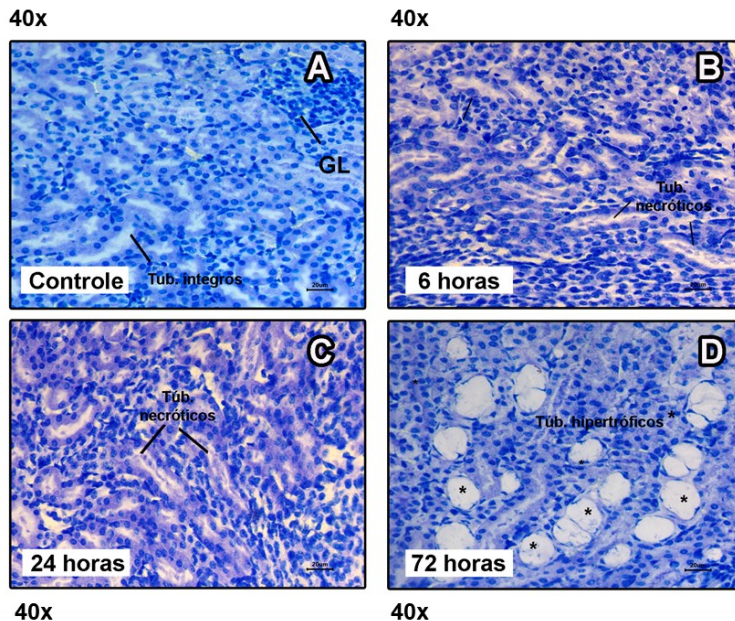


Figura 24: Histologia renal de camundongos inoculados com $\frac{1}{2}$ DL₅₀ de veneno de *Loxosceles aff. variegata*, após coloração de azul de toluidina. (A) Túbulos e glomérulos renais íntegros. (B) Túbulos necróticos (setas). (C) Túbulos necróticos (setas). (D) Túbulos hipertróficos (*).

Por outro lado, os camundongos inoculados com o veneno de *L. aff. variegata* apresentaram danos renais menos graves. Nas primeiras 6 a 24 horas (figura 23B e 23C), foram observados túbulos necróticos, e após 72 horas (figura 23D), surgiram túbulos hipertróficos. Conforme indicado pela urinálise, os danos causados pelo veneno de *L. amazonica* ocorrem mais rapidamente do que pelo veneno de *L. aff. variegata*, o que pode explicar por que os danos renais observados na histologia foram menores.

Com relação a análise histológica, somente um paciente do estudo de Albuquerque *et al.*, (2018) foi submetido a biópsia que evidenciou nefrite intersticial e necrose tubular aguda, semelhante a um dos casos descritos por França *et al.*, (2002). A análise de alguns órgãos de camundongos após envenenamento com várias doses

de veneno de *L. intermedia* revelou alterações notáveis no rim, dentre elas, necrose tubular aguda foi vista em vários néfrons, acompanhada de deposição de material eosinofílico dentro dos túbulos renais proximais e distais (TAMBOURGI *et al.*, 1998b). Em outro estudo, histologias renais de camundongos expostos ao veneno de *L. intermedia* revelaram hialinização e presença de eritrócitos no espaço de Bowman, colapso glomerular, citotoxicidade em células epiteliais tubulares e depósito de material eosinofílico no lúmen dos túbulos. Observações ultraestruturais indicaram citotoxicidade em células epiteliais e endoteliais glomerulares, alterações na membrana basal e degeneração de células epiteliais tubulares (LUCIANO *et al.*, 2004).

Os resultados da análise histopatológica dos rins corroboram com as alterações observadas nas demais análises. A deposição de material eosinofílico amorfo sugestivo de proteína nos túbulos reflete a significativa proteinúria detectada tanto nas urinálises quanto nos SDS-PAGE realizados. As lesões tubulares e glomerulares, indicadas pela presença de proteínas de baixo e alto peso molecular na urina, respectivamente, também foram confirmadas no exame histopatológico. Além disso, esses achados estão de acordo com os resultados bioquímicos nos coelhos, que evidenciam dano renal pelo aumento dos níveis de ureia e creatinina, especialmente nos animais inoculados com *L. amazonica*.

5. Conclusões

O loxoscelismo, particularmente causado por *Loxosceles amazonica* e *L. aff. variegata*, é uma preocupação crescente em áreas urbanas do Nordeste e Sudeste do Brasil. Este estudo foi conduzido com o objetivo de caracterizar aspectos fisiopatológicos locais, sistêmicos e imunológicos induzidos pelo veneno dessas espécies em ensaios *in vivo* e as propriedades hemotóxicas dos venenos em ensaios *in vitro*. Foi demonstrado que o veneno de *Loxosceles amazonica* induzem agregação plaquetária enquanto o *L. aff. variegata* inibi a agregação plaquetária, ambos causaram hemólise sem presença de soro e possuem atividade fibrinogenolítica, indicando potenciais efeitos hemotóxicos.

Através da avaliação dos efeitos macroscópicos locais do envenenamento experimental em coelhos, observou-se a formação de lesões cutâneas necróticas típicas, com edema e halo hemorrágico mais pronunciados no grupo de *L. aff. variegata* em comparação com *L. amazonica*. Além de alterações hematológicas (leucopenia, trombocitopenia e subsequente leucocitose), bioquímicas séricas (aumento ALT, CK, CK-MB e Ureia) e imunológicas (aumento de IL-6) em amostras coletadas dos coelhos envenenados com implicações na cascata inflamatória, coagulação e possíveis danos cardíacos, renais e hepáticos para ambos os venenos.

A DL50 foi determinada, permitindo a definição de uma dose subletal para os ensaios subsequentes. Com o envenenamento experimental em camundongos com dose subletal foi possível monitorar sinais de lesão renal, através de tira reagentes onde detectou presença de proteínas, sangue e leucócitos na urina. Na análise histopatológica dos rins onde teve deposição de material eosinofílico amorfo sugestivo de proteína nos túbulos renais, reflete a significativa proteinúria detectada tanto na urinálise quanto nos SDS-PAGE realizados, além de lesões tubulares e glomerulares. Esses achados estão de acordo com os resultados bioquímicos nos coelhos, que evidenciam dano renal pelo aumento dos níveis de ureia, especialmente nos animais inoculados com *L. amazonica*.

Ao comparar com a literatura, sugere-se que o veneno dessas espécies seja um pouco mais brando, mas ainda capaz de causar alterações significativas, como lesões cutâneas necróticas e distúrbios hematológicos, renais e cardiovasculares. O

estudo reforça a toxicidade comparável das espécies estudadas com outras de importância médica no Brasil, sugerindo que o manejo clínico desses casos deve ser cauteloso.

Quadro 1: Principais achados dos venenos de *L. amazonica* e *L. aff. variegata* em diferentes abordagens.

Abordagem	<i>L. amazonica</i>	<i>L. aff. variegata</i>
Agregação plaquetária	Indução de agregação plaquetária.	Inibição de agregação plaquetária induzida.
Hemólise	- Hemólise dependente de complemento - Tipos sanguíneos ABO são igualmente suscetíveis à hemólise. - Eritrócitos Rh-negativos são mais suscetíveis à hemólise.	- Hemólise dependente de complemento - Tipos sanguíneos ABO são igualmente suscetíveis à hemólise. - Eritrócitos Rh-negativos são mais suscetíveis à hemólise.
Atividade fibrinogenolítica	Atividade fibrinogenolítica significativa.	Atividade fibrinogenolítica significativa.
Lesões cutâneas	Lesões necróticas típicas, menos edema.	Lesões necróticas típicas, mais edema e halo hemorrágico.
Alterações hematológicas	Leve anemia, leucocitose associada a granulocitose, linfopenia, monocitose e plaquetopenia seguida de plaquetocitose.	Leve anemia, leucocitose associada a granulocitose, linfopenia, monocitose e plaquetopenia seguida de plaquetocitose.
Alterações bioquímicas	Aumento de ALT, CK, CK-MB e ureia.	Aumento de ALT, AST e CK.
Dosagem citocinas	Aumento de IL-6.	Aumento de IL-6.
DL50	1,81 mg/kg.	1,72 mg/kg.
Lesão renal (Fita reagente)	Proteínas, sangue, leucócitos na urina; alterações mais pronunciadas.	Proteínas, sangue, leucócitos na urina; alterações menos pronunciadas.
Lesão renal (SDS-PAGE)	Albuminúria, lesões tubulares e glomerulares.	Albuminúria tardia e lesões tubulares e glomerulares.
Lesão renal (Histopatologia)	Deposição de material eosinofílico amorfo, túbulos hipertróficos, necrose tubular e glomérulo isquêmico.	Túbulos hipertróficos e necrose tubular.

6. Referências Bibliográficas

- ALBUQUERQUE, H. N. de; BARBOSA, A. R.; ALBUQUERQUE, I. C. S. de; MENEZES, I. R. de. Registro de *Loxosceles amazonica* Gertsch , 1967 (*Aranae, Sicariidae*) no Cariri Paraibano. **Revista De Biologia E Ciências Da Terra**, v. 5, n. 1, p. 1–4, 2004. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50050110>>.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; TESSAROLO, L. D.; MENEZES, F. H.; DE LIMA, T. B.; PAIVA, J. H. H. G. L.; DA SILVA JÚNIOR, G. B.; MARTINS, A. M. C.; DAHER, E. de F. Acute kidney injury due to systemic Loxoscelism: A cross sectional study in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 695–699, 2018.
- ALMEIDA, M. Q.; SALVATIERRA, L.; CARVALHO, T. G.; PRESTES, F. J.; BRESCOVIT, A. D.; GASNIER, T. R. Muito tempo sem ver: Expansão dos registros de *Loxosceles amazonica* (Araneae: Sicariidae) para o estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 2, p. 163–166, 2017.
- APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 2, p. 167–178, 2008.
- BARBARO, K. C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 489–499, 2005.
- BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; ARAÚJO, C. A.; PAREJA-SANTOS, A.; TÁVORA, B. C. L. F.; PREZOTTO-NETO, J. P.; KIMURA, L. F.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M. L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 972–979, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.022>>.
- BARBARO, K. C.; FERREIRA, M. L.; CARDOSO, D. F.; EICKSTEDT, I. M. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **J. Brazilian journal of medical and biological research**, 29 (1996), pp. 1491-1497.
- BERTONI DA SILVEIRA, R.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241–1253, 2006.
- BERTONI, R.; MEIRI, O.; CARLOS, O.; GREMSKI, W.; PETER, C.; NADER, H. B.; SANCHES, S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- b -N-acetyl- D -hexosaminidases hydrolases. v. 49, p. 758–768, 2007.
- BINFORD, G. J.; BODNER, M. R.; CORDES, M. H. J.; BALDWIN, K. L.; RYNERSON, M. R.; BURNS, S. N.; ZOBEL-THROPP, P. A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in *sicariid* spider venoms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 3, p. 547–566, 2009.
- BOIA-FERREIRA, M.; MORENO, K. G.; BAS, A. B. C.; SILVA, L. P.; VUITIKA, L.; SOLEY, B.; WILLE, A. C. M.; BARBARO, K. C.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; SEN, A.

Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. **Cells**, v. 8, n. 1489, p. 1–20, 2019.

BRAZ, A.; MINOZZO, J.; ABREU, J. C.; GUBERT, I. C.; CARLOS CHÁVEZ-OLÓRTEGUI. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 37, n. 9, p. 1323–1328, 1999.

CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 2, p. 84–96, 2011a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.11.005>>.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 1, p. 64–77, 2006.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C. M.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Tools for biological purposes. **Toxins**, v. 3, n. 3, p. 309–344, 2011b.

CHATZAKI, M.; HORTA, C. C.; ALMEIDA, M. O.; PEREIRA, N. B.; MENDES, T. M.; DIAS-LOPES, C.; GUIMARÃES, G.; MORO, L.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; HORTA, M. C. R.; KALAPOTHAKIS, E. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 21–30, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.007>>.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; MOURA, J. De; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a Direct Hemolytic Effect Dependent on the Catalytic Activity Induced by Phospholipase-D (Dermonecrotic Toxin) From Brown Spider Venom. v. 666, n. February, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; MATSUBARA, F. H.; SCHEMCZSEN-GRAEFF, Z.; DE BONA, E.; HEIDEMANN, V. R.; GUERRA-DUARTE, C.; GREMSKI, L. H.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; ARNI, R. K.; VEIGA, S. S. Brown spider (*Loxosceles*) venom toxins as potential biotools for the development of novel therapeutics. **Toxins**, v. 11, n. 6, 2019.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ZANETTI, V. C.; FERREIRA, A. P.; MINOZZO, J. C.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon**, v. 36, n. 4, p. 563–569, 1998.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; HELENA APPEL, M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004.

DA SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; DOS SANTOS, F. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 155–161, 2003.

DA SILVEIRA, R. B.; DOS SANTOS FILHO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VON DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom

glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 815–822, 2002.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289–300, 2007a.

DA SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C. M.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R. C.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochemical Journal**, v. 406, n. 2, p. 355–363, 2007b.

DAHLÉN, T.; CLEMENTS, M.; ZHAO, J.; OLSSON, M. L.; EDGREN, G. An agnostic study of associations between ABO and RhD blood group and phenome-wide disease risk. **eLife**, v. 10, p. 1–12, 2021.

DANTAS, A. E.; HORTA, C. C. R.; MARTINS, T. M. M.; DO CARMO, A. O.; MENDES, B. B. R. D. O.; GOES, A. M.; KALAPOTHAKIS, E.; GOMES, D. A. Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts. **Toxicon**, v. 84, p. 56–64, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.002>>.

DE-BONA, E.; CHAVES-MOREIRA, D.; BATISTA, T. B. D.; JUSTA, H. C. da; ROSSI, G. R.; ANTUNES, B. C.; MATSUBARA, F. H.; MINOZZO, J. C.; WILLE, A. C. M.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, L. H. Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 146, n. July 2020, 2021.

DE OLIVEIRA CHRISTOFF, A.; DE OLIVEIRA, A.; CHAIM, O. M.; LUGARINI, D.; BASTOS PEREIRA, A. L.; PALUDO, K. S.; QUEIROZ TELLES, J. E.; BRACHT, A.; VEIGA, S. S.; ACCO, A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 695–704, 2008.

DE OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, J. M. C.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 421–429, 2005.

DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 151–156, 2008.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; GUIMARÃES, G.; GOMES, E. R. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.; DAMASCENO, D.; MARTINS, M.; KALAPOTHAKIS, E.; ALMEIDA, A. P.; GRANIER, C.; CRUZ, J. S.; GUATIMOSIM, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1426–1435, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.008>>.

DRAGULEV, B.; BAO, Y.; RAMOS-CERRILLO, B.; VAZQUEZ, H.; OLVERA, A.; STOCK, R.; ALGARON, A.; FOX, J. W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: Insights into spider venom dermonecrosis [2]. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1264–1266, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700644>>.

DUARTE, Glória Isolina Boente Pinto. PRINCIPAIS ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS EM PESQUISA EXPERIMENTAL. **Bioética e Manejo de Animais de Laboratório**, [S.L.], p. 12-18, 19 set. 2022. Atena Editora.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C. Q. B.; GRANER, E. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. v. 36, n. 7, p. 1039–1051, 1998.

FELICORI, L.; ARAUJO, S. C.; MACHADO DE ÁVILA, R. A.; SANCHEZ, E. F.; GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 509–519, 2006.

FERNANDES-PEDROSA, M. de F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. de L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–12, 2008.

FERNANDES, L. P.; ROCHA, M. N.; DUARTE, C. G.; MINOZZO, J. C.; DO MONTE-NETO, R. L.; FELICORI, L. F. Validation of a colorimetric LAMP to detect *Loxosceles* experimental envenomation. **Toxicon**, v. 216, p. 50–56, 2022.

FERRER, P.; MARI, T. L. De; GREMSKI, L. H.; SILVA, D. T.; BERTONI, R.; GREMSKI, W.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. v. 7, n. 5, p. 1–12, 2013.

FINGERMAN, M.; DE ROODT, A. R.; CASCON, O.; MIRANDA, M. V. Biotechnological potential of Phospholipase D for *Loxosceles* antivenom development. **Toxicon: X**, v. 6, 2020.

FRANÇA, F. O. de S.; BARBARO, K. C.; ABDULKADER, R. C. R. de M. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. p. 287–290, 2002.

FUKUDA, D. A.; CAPORRINO, M. C.; BARBARO, K. C.; DELLA-CASA, M. S.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MAGALHAES, G. S. Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* binds to platelets and promotes phosphatidylserine exposure. **Toxins**, v. 9, n. 6, 2017.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261–267, 1992.

GENDRON, B. P. *Loxosceles reclusa* envenomation. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 8, n. 1, p. 51–54, 1990.

GOMEZ, H. F.; KRYWKO, D. M.; STOECKER, W. V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. **Annals of Emergency Medicine**, v. 39, n. 5, p. 469–474, 2002.

GRASHOF, D.; ZDENEK, C. N.; DOBSON, J. S.; YOUNGMAN, N. J.; COIMBRA, F.; BENARD-VALLE, M.; ALAGON, A.; FRY, B. G. A web of coagulotoxicity: Failure of antivenom to neutralize the destructive (non-clotting) fibrinogenolytic activity of *Loxosceles* and *Sicarius* spider venoms. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 1–14, 2020.

GREMSKI, L. H.; DA JUSTA, H. C.; DA SILVA, T. P.; POLLI, N. L. C.; ANTUNES, B. C.; MINOZZO, J. C.; WILLE, A. C. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; ARNI, R. K.; VEIGA, S. S. Forty years of the description of brown spider venom phospholipases-D. **Toxins**, v. 12, n. 3, 2020.

GREMSKI, L. H.; DA JUSTA, H. C.; POLLI, N. L. C.; SCHLUGA, P. H. de C.; THEODORO, J.

L.; WILLE, A. C. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Systemic Loxoscelism, Less Frequent but More Deadly: The Involvement of Phospholipases D in the Pathophysiology of Envenomation. **Toxins**, v. 15, n. 1, 2022.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M. A.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M. I.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403–2416, 2010.

GREMSKI, L. H.; MATSUBARA, F. H.; DA JUSTA, H. C.; SCHEMCZSSEN-GRAEFF, Z.; BALDISSERA, A. B.; DE CAIRES SCHLUGA, P. H.; DE OLIVEIRA LEITE, I.; BOIA-FERREIRA, M.; WILLE, A. C. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown spider venom toxins: What are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins? **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 27, n. January 2021, p. 1–15, 2021.

GREMSKI, L. H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MEISSNER, G. O.; WILLE, A. C. M.; VUITIKA, L.; DIAS-LOPES, C.; ULLAH, A.; DE MORAES, F. R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; BARBARO, K. C.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>>.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, v. 44, n. 6, p. 608–624, 2004.

HORTA, C. C. R.; OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; DO CARMO, A. O.; SIQUEIRA, F. F.; BARROCA, T. M.; DOS SANTOS NASSIF LACERDA, S. M.; DE ALMEIDA CAMPOS, P. H.; DE FRANÇA, L. R.; FERREIRA, R. L.; KALAPOTHAKIS, E. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with loxosceles spider venom. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1682–1685, 2013.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. p. 2039–2047, 2011.

JUSTA, H. C. da; GONZÁLEZ, J. E. H.; VUITIKA, L.; MARIUTTI, R. B.; MAGNAGO, P. A. M.; MORAES, F. R. de; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, L. H.; ARNI, R. K.; VEIGA, S. S. Comparative Biochemical , Structural , and Functional Analysis of Recombinant Phospholipases D from Three *Loxosceles* Spider Venoms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12006, 2023.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S. C.; DE CASTRO, C. S.; MENDES, T. M.; GOMEZ, M. V.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1691–1699, 2002.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L. J.; BARRETT, J. T.; CAMPBELL, B. J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **BBA - General Subjects**, v. 678, n. 3, p. 467–476, 1981.

LANGNER, T. R.; GANATRA, H. A.; SCHWERDTFAGER, J.; STOECKER, W.; THORNTON, S. Viscerocutaneous loxoscelism manifesting with myocarditis: A case report. **American Journal of Case Reports**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2021.

LE BRICON, T.; ERLICH, D.; BENGOUFA, D.; DUSSAUCY, M.; GARNIER, J. P.; BOUSQUET, B. Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis of urinary proteins: Application to multiple myeloma. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1191–1197, 1998.

LOPES, P. H.; FUKUSHIMA, C. S.; SHOJI, R.; BERTANI, R.; TAMBOURGI, D. V. Searching for the toxic potential of *Loxosceles amazonica* and *Loxosceles willianilsoni* spiders' venoms. **Toxicon**, v. 191, n. November 2020, p. 1–8, 2021.

LOPES, P. H.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; MARQUES, M. O. T.; TAMBOURGI, D. V. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1461–1477, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02719-0>>.

LUCIANO, M. N.; SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; LUCIA, V.; SANTOS, P.; FRANCO, C. R. C.; SOARES, M. F. S.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Experimental Evidence for a Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venom in Renal Tissue The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. v. 52, n. 4, p. 455–467, 2004.

MACHADO, L. F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E. D.; RICART, C. A. O.; FONTES, W.; BARBARO, K. C.; ROEPSTORFF, P.; VALLE DE SOUSA, M. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, n. 8, p. 2167–2176, 2005.

MAGALHÃES, G. S.; CAPORRINO, M. C.; DELLA-CASA, M. S.; KIMURA, L. F.; PREZOTTO-NETO, J. P.; FUKUDA, D. A.; PORTES-JUNIOR, J. A.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1773–1783, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.002>>.

MALAUQUE, C. M. S.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo , Brazil. v. 44, n. 3, p. 139–143, 2002.

MALAUQUE, C. M. S.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L. C.; CONDE, M. R.; NOVAES, C. T. G.; RISK, J. Y.; FRANÇA, F. O. S.; DE MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664–671, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.011>>.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 36, n. 12, p. 1749–1800, 1998.

MARTINS, D.C.G. *Tratamento da lesão dermonecrótica induzida pelo veneno de Loxosceles laeta com dapsona e células-tronco mesenquimais*. 2014. 79f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MCGLASSON, D. L.; HARROFF, H. H.; SUTTON, J.; DICK, E.; ELSTON, D. M. Cutaneous and systemic effects of varying doses of brown recluse spider venom in a rabbit model. **Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology**, v. 20, n. 2, p. 99–105, 2007.

MEDINA-SANTOS, R.; GUERRA-DUARTE, C.; DE ALMEIDA LIMA, S.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; ALVES DE AQUINO, P.; OLIVEIRA DO CARMO, A.; FERREYRA, C. B.; GONZALEZ-KOZLOVA, E. E.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Diversity of astacin-like metalloproteases identified by transcriptomic analysis in Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom and in vitro activity characterization. **Biochimie**, v. 167, p. 81–92, 2019.

MOREIRA, D. C. Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (Aranha marrom) e seus mecanismos moleculares. p. 1–108, 2008.

NAVARRO-MARTINEZ, D. A.; BERARDUCCI, J.; ARMENTA-MORENO, J. I.; ARMENDARIZ-FERRARI, J. C.; GARCIA-CARDENAS, M.; FERNANDEZ-BADILLO, V.; ESPINOLA-ZAVALETA, N. Kounis Syndrome: Acute Coronary Syndrome Induced by a *Loxosceles Laeta* Bite in a 9-Year-Old Boy. **Case**, v. 6, n. 10, p. 450–453, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.case.2022.09.001>>.

OLIVEIRA-MENDES, B. B. R. de; CHATZAKI, M.; SALES-MEDINA, D. F.; LEAL, H. G.; VAN DER VEER, R.; BISCOTO, G. L.; GONÇALVES, P. M.; SOARES DA SILVA, T.; GUERRA-DUARTE, C.; KALAPOTHAKIS, E.; HORTA, C. C. R. From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: An overview focused on *Loxosceles similis*. **Toxicon**, v. 173, n. September 2019, p. 5–19, 2020.

PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M. P.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAICO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R. C.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 323–333, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.009>>.

PELLEGRINI, T. G.; FERREIRA, R. L. Are inner cave communities more stable than entrance communities in Lapa Nova show cave? **Subterranean Biology**, v. 20, n. 1, p. 15–37, 2016.

PETRICEVICH, V. L. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. **Current Drug Targets: Inflammation and Allergy**, v. 3, n. 3, p. 325–332, 2004.

PLENGE-TELLECHEA, L. F.; HERNÁNDEZ-RAMOS, Á. D.; MUÑOZ, J. M.; BARRAZA-GARZA, G.; RICO-ESCOBAR, E.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, D. Acanthocytosis and brain damage in area postrema and choroid plexus: Description of novel signs of *Loxosceles apachea* envenomation in rats. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–13, 2019.

POLLI, N.L.C. Proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* utilizando fosfolipases-D mutadas recombinantes como antígeno. 2020. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba

PRETEL, F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; DA SILVA, M. E. R.; FERREIRA, J. M. C.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adalaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 449–458, 2005.

SCHULTZE, A. E.; JENSEN, R. K. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Canine Urinary Proteins for the Analysis and Differentiation of Tubular and Glomerular Diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 4, p. 93–97, 1989.

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L. C.; VON EICKSTEDT, V. R.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 5, p. 546–548, 1998.

SILVA-MAGALHÃES, R.; SILVA-ARAÚJO, A. L.; PERES-DAMÁSIO, P.; TEIXEIRA PEREIRA, E. H.; DE OLIVEIRA SOUZA, R.; VARELA, L. S. da R. N.; TOMÉ, L. M. R.; DE MELO IANI, F. C.; SILVEIRA, A. L.; BORGES, M. H.; MEDINA-SANTOS, R.; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C.; VASCONCELOS DINIZ, M. R.; PAIVA, A. L. B.; GUERRA-DUARTE, C. *Loxosceles amazonica* Brown Spider venom: Insights into enzymatic activities, immunorecognition, and novel phospholipase D isoforms. **Biochimie**, 2024.

SILVEIRA, A. L. New geographic records of the brown spider *Loxosceles amazonica* Gertsch,

1967 (*Araneae, Sicariidae*) in Northeastern Brazil and its medical importance. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 1, p. 37–45, 2015.

SILVESTRE, F. G.; CASTRO, C. S. D.; MOURA, J. F. D.; GIUSTA, M. S.; MARIA, M. De; ÁLVARES, É. S. S.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; GONÇALVES, L. A.; GUBERT, I. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis Moenkhaus*, 1898 (*Araneae, Sicariidae*). **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 927–936, 2005.

STOECKER, W. V.; GREEN, J. A.; GOMEZ, H. F. Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 5, p. 888–890, 2006.

TAMBOURGI, D. V.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113–1119, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>>.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W.; MORGAN, B. P.; DE ARAUJO, P. S.; ALVES, E. W.; DA SILVA, W. D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 1, p. 366–373, 1998a.

TAMBOURGI, D. V.; MORGAN, B. P.; DE ANDRADE, R. M. G.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 683–691, 2000a.

TAMBOURGI, D. V.; MORGAN, B. P.; ANDRADE, R. M. G. De; MAGNOLI, C.; BERG, C. W. Van Den. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. v. 95, n. 2, p. 683–691, 2000b.

TAMBOURGI, D. V.; PETRICEVICH, V. L.; MAGNOLI, F. C.; ASSAF, S. L. M. R.; JANCAR, S.; TAMBOURGI, D. V.; PETRICEVICH, V. L.; MAGNOLI, F. C.; ASSAF, S. L. M. R. Endotoxemic-like shock induced by loxosceles spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. v. 36, n. 2, p. 391–403, 1998b.

TAVARES, F. L.; CIRILLO SOUSA-E-SILVA, M. C.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C.; MORETTI REBECCHI, I. M.; SANO-MARTINS, I. S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Human and Experimental Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 477–486, 2004.

TAVARES, F. L.; PEICHOTO, M. E.; MARCELINO, J. R.; BARBARO, K. C.; CIRILLO, M. C.; SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S. Platelet participation in the pathogenesis of dermonecrosis induced by *Loxosceles gaucho* venom. **Human and Experimental Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 666–676, 2016.

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

THEODORO, J. L.; DA JUSTA, H. C.; DE CAIRES SCHLUGA, P. H.; FISCHER, M. L.; MINOZZO, J. C.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S. Subtranscriptome analysis of phospholipases D in *Loxosceles* venom glands: Confirmation of predominance, intra-species diversity, and description of novel isoforms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280,

n. June, 2024.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3 ed. 2017.

TIJANI, M. K.; DANIELSSON, L.; STORRY, J. R.; OLSSON, M. L.; PERSSON, K. E. M. *Babesia divergens* Shows Equal Predilection for Human ABO Blood Types in an In Vitro Erythrocyte Preference Assay. 2023.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21–32, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.10.003>>.

VAN DER MEIDE, P.H., SCHELLEKENS, H., 1996. Cytokines and the immune response. **Biotherapy** 8, 243–249.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; BRAZ, A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 7, p. 843–850, 2001.

WESCHE P. Rodents: Clinical pathology. In: Keeble E, Meredith A, editors. **BSAVA manual of rodents and ferrets**. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association; p. 42–51. 2009

ZANETTI, V. C.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 13, n. 2, p. 135–148, 2002.

7. Anexo

7.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Caracterização fisiopatológica dos venenos das aranhas marrom *Loxosceles amazônica* e *Loxosceles aff.variegata***”, registrado com o nº **002/2023**, sob a responsabilidade de **Clara Guerra Duarte**- que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, em 19/04/2023.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	26/04/2023 a 26/04/2025
Espécie/linhagem/raça	93 camundongos heterogênicos/ 12 coelhos
Nº de animais	93 e 12
Peso/Idade	Camundongos: 6-8 semanas, 18-22g Coelhos: 4 meses, 1,8 – 2,2 Kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Camundongos: Biotério de Produção da Funed Coelhos: Fazenda do Instituto Vital Brazil

Informações aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste parecer e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-FUNED o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e nas publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008 e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, ou seja, até **02/05/2025**.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2023.

Documento assinado digitalmente
 RITA FLÁVIA LAURENTI RIBEIRO
 Data: 28/04/2023 16:10:58-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RITA FLÁVIA LAURENTI RIBEIRO
 Coordenadora da CEUA/FUNED

Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, MG.
 CEP 30510-010 Telefone: (31) 3314-4645

7.2. Autorização plataforma Brasil

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS -
FUNED



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização bioquímica e imunológica de venenos de aracnídeos de potencial importância médica do Estado de Minas Gerais.

Pesquisador: CLARA GUERRA DUARTE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52987121.4.0000.9507

Instituição Proponente: Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento

Patrocinador Principal: Fundação Ezequiel Dias

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.212.825

Apresentação do Projeto:

Conforme documento: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1845775.pdf

Resumo:

O Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde informa que Minas Gerais é o estado que apresenta maior número de acidentes com animais peçonhentos no Brasil, notavelmente por aracnídeos. As aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles*, relatadas como de ocorrência sinantrópica nesse estado, são capazes de causar acidentes relevantes em humanos, mas que não tiveram seus venenos devidamente descritos. Assim, o presente trabalho possui como objetivo realizar a caracterização bioquímica e antigênica preliminar do veneno das *Loxosceles*, bem como traçar o perfil de suas toxinas relacionando-as com os soros terapêuticos correlatos. O padrão proteico do veneno *Loxoscélico* foi realizado através de eletroforese, por meio deste observou-se que há variabilidade das proteínas dos venenos analisados. Visando a caracterização antigênica deste, realizou-se ensaios de ELISA e Western Blot para avaliar a reatividade dos venenos com os soros comerciais existentes. Foi visto que todos os venenos testados apresentaram reatividade consistente com os soros correlatos em ambos os ensaios. Western Blot's realizados com anticorpos específicos evidenciou presença das proteínas esfingomielinase, metaloprotease e hialuronidase nestes venenos. Realizou-se por fim os ensaios de atividade fibrinogenolítica, de atividade de hialuronidase e de esfingomielinase, no qual pode-

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@funed.mg.gov.br

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED



Continuação do Parecer: 5.212.825

se inferir que há presença dessas atividades nos venenos loxoscélicos, já que houve degradação das subcadeias do fibrinogênio em todos, sendo uns capazes de degradar a subunidade alfa e outros as subunidades beta e/ou gama, embora as principais classes de toxinas terem sido evidenciadas nestes venenos, estudos in vitro de hemólise e inibição e agregação plaquetária, bem como outros posteriores são necessários para a completa caracterização deste veneno. Devido a importância médica relacionada ao Loxoscelismo, este estudo é de suma importância, uma vez que seus resultados contribuem para a caracterização dos veneno de Loxosceles.

Hipótese:

.Os venenos loxoscélicos em questão têm capacidade de causar hemólise intravascular e agregação e inibição plaquetária ?

Metodologia Proposta:

Ensaio de Hemólise - •Sangue humano de doadores será coletado por meio de punção venosa e armazenado em tubos contendo tampão citrato de sódio (BD Plastipak, Franklin Lakes).•Este material será centrifugado a 166 xg por 15 minutos para retirada do soro. •As hemácias serão lavadas 3 vezes com solução de Ringer Lactato (0,6% NaCl, 0,03% KCl, 0,02% CaCl, 0,31% lactato de sódio) ou Tris Sucrose - TBS (250 mM sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH7,4, 280 mOsm/kg H₂O). •Eritrócitos humanos a uma concentração específica pré-determinada serão incubados com solução de anticorpos e veneno por 24 horas a 37 °C sob agitação suave. •As amostras serão centrifugadas a 166 xg por 5 minutos e, o sobrenadante analisado em espectrofotômetro, à 570 nm (CHAVES-MOREIRA et al., 2009; KARIM-SILVA et al., 2016; VUITIKA et al., 2016). •O ideal é que os ensaios sejam realizados em triplicata, em dois experimentos independentes, tendo como controle negativo (ringer lactato) e positivo (hemácias em água destilada ou 0,01% (v/v) de Triton X-100). •Os valores de absorbância deverão ser convertidos em porcentagem de hemólise. Ensaio Agregação e inibição plaquetária Protocolo - 1. Ligar o equipamento- Ligar o AggRAM (ambos);- Ligar impressora;- Ligar CPU;- Ligar Monitor. 2. Preparação do PRP e PPP- Coletar o sangue;- Centrifugar por 10 minutos em 800 rpm -> retirar Plasma Rico em Plaquetas (PRP) com uma pipeta de plástico e passar para tubo falcon de 15mL devidamente identificado;- Centrifugar por 15 min em 3200 rpm (2 tubos previamente centrifugados a 800 rpm) -> retirar o Plasma Pobre em Plaquetas e passar, com auxílio de pipeta de plástico, para tubo falcon de 15mL devidamente identificado;- Após preparados os tubos podem ser colocados nos canais maiores do AggRAM para que a

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@funed.mg.gov.br

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED



Continuação do Parecer: 5.212.825

temperatura. O Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde informa que Minas Gerais é o estado que

apresenta maior número de acidentes com animais peçonhentos no Brasil, notavelmente por aracnídeos. O gênero *Loxosceles* pertencente a família Sicariidae (aranhas araneomorfas), relatado como de ocorrência sinantrópica nesse estado, possui espécies capazes de causar acidentes relevantes em humanos, mas que não teve seu veneno devidamente descrito. Popularmente conhecida como aranha marrom, as aranhas do gênero *Loxosceles* representam maior prevalência dentre os acidentes de importância médica, estas possuem hábito noturno e cefalotorác em formato de violino. O veneno das *Loxosceles* possui importantes toxinas que são responsáveis por diversas reações inflamatórias locais e disseminadas, são estas as esfingomielinases D, metaloproteases e hialuronidases. As lesões provenientes da picada da Aranha marrom atingem às membranas celulares e o endotélio vascular, isso resulta na ativação da cascata do sistema complemento e da coagulação, a ativação das cascatas ocasionam intensos processos inflamatórios que obstruem os vasos podem causar edema, hemorragia isquemia e necrose, essa ativação está relacionada também à ocorrência de hemólises intravasculares. Devido a importância médica relacionada ao Loxoscelismo, este estudo é de suma importância, uma vez que seus resultados contribuem para a caracterização do veneno das aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles*, bem como para o conhecimento desta espécie ainda pouco estudada.

Objetivo da Pesquisa:

Extraído do documento: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1845775.pdf: Objetivo Primário:

.Caracterização molecular, bioquímica e antigênica dos venenos pouco explorados das aranhas *Loxosceles* de potencial importância médica no Estado de Minas Gerais. Traçar o perfil de suas toxinas relacionando-as com os soros terapêuticos correlatos.

Objetivo Secundário: Não indicado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Extraído do documento: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1845775.pdf:

Riscos:

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@funed.mg.gov.br

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED



Continuação do Parecer: 5.212.825

.A coleta sanguínea é um procedimento invasivo, e este possui alguns riscos tais como hematoma local devido ao extravasamento de sangue para o tecido, inchaço, rubor, estresse e riscos de infecções secundárias devido ao rompimento da epiderme.

Benefícios:

.A coleta sanguínea propiciará o material necessário para a realização dos ensaios de hemólise intravascular e agregação e inibição plaquetária, o que irá contribuir para o objetivo principal da pesquisa e consequentemente para a saúde coletiva no que diz respeito a acidentes com animais peçonhentos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa contribuirá para avanços no conhecimento científico a respeito de um veneno ainda pouco conhecido. Os resultados trarão benefícios indiretos aos participantes, uma vez que poderão auxiliar no entendimento dos efeitos induzidos pelos venenos e assim poderão contribuir para novas estratégias de tratamento. Adicionalmente, este conhecimento poderá revelar moléculas com potencial biotecnológico no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*.

Sobre Avaliação dos riscos e benefícios: Os riscos estão bem descritos conforme texto acima. Entretanto, o pesquisador não deixa claro quais os benefícios advindos da metodologia proposta para os participantes da pesquisa e a coletividade

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As adequações solicitadas na Submissão 1 foram realizadas, estando os termos de apresentação obrigatória de acordo com a resolução vigente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as adequações solicitadas foram realizadas. Sem pendências a serem consideradas.

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@funed.mg.gov.br

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED



Continuação do Parecer: 5.212.825

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e complementares, e pela Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação deste projeto. Ressalta-se que deve ser encaminhado um Relatório Parcial de acompanhamento da pesquisa semestralmente na forma de notificação na Plataforma Brasil, assim como um Relatório Final ao término da pesquisa, com intuito de esclarecer que a pesquisa foi realizada em conformidade com os aspectos éticos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1845775.pdf	16/12/2021 14:35:27		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_image.pdf	16/12/2021 14:34:52	CLARA GUERRA DUARTE	Aceito
Outros	Curriculo_lattes_pesq_aqui.pdf	16/12/2021 14:34:22	CLARA GUERRA DUARTE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_lox.docx	16/12/2021 14:25:44	CLARA GUERRA DUARTE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.docx	16/12/2021 14:21:48	CLARA GUERRA DUARTE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 26 de Janeiro de 2022

Assinado por:
MARCOS VINICIUS FERREIRA SILVA
(Coordenador(a))

Endereço: CONDE PEREIRA CARNEIRO

Bairro: GAMELEIRA

CEP: 30.510-010

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3314-4004

E-mail: cepfuned@funed.mg.gov.br

7.3. Autorização Sisgen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A651423

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A651423**
 Usuário: **FUNED**
 CPF/CNPJ: **17.503.475/0001-01**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Loxosceles spp

Phoneutria spp

Título da Atividade: **Caracterização bioquímica e imunológica de venenos de aracnídeos de potencial importância médica do Estado de Minas Gerais.**

Equipe

Clara Guerra Duarte	FUNED
Ana Luiza Bittencourt Paiva	FUNED
Elaine Henriques Teixeira Pereira	FUNED
Paula Von Randow Cardoso	FUNED
Letícia Rocha da Fonseca	FUNED
Rafaela Silva Magalhães	FUNED

Parceiras Nacionais

17.217.985/0001-04 / Universidade Federal de Minas Gerais

Data do Cadastro: **24/09/2020 16:44:12**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:45** de **24/09/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

7.4. Artigo publicado: *Loxosceles amazonica* Brown Spider venom: Insights into enzymatic activities, immunorecognition, and novel phospholipase D isoformas



Loxosceles amazonica Brown Spider venom: Insights into enzymatic activities, immunorecognition, and novel phospholipase D isoforms

Rafaela Silva-Magalhães ^{a, e}, Ana Luiza Silva-Araújo ^a, Pamella Peres-Damásio ^a, Elaine Henriques Teixeira Pereira ^a, Ramon de Oliveira Souza ^a, Luana Silveira da Rocha Nowicki Varela ^b, Luiz Marcelo Ribeiro Tomé ^c, Felipe Campos de Melo Iani ^c, Adriano Lima Silveira ^d, Márcia Helena Borges ^b, Raíssa Medina-Santos ^e, Carlos Chavez-Olórtegui ^e, Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz ^a, Ana Luiza Bittencourt Paiva ^a, Clara Guerra-Duarte ^{a, *}

^a Molecular Toxinology Lab, Research and Development Department, Ezequiel Dias Foundation - Funed, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Arachnid Proteomics Lab, Research and Development Department, Ezequiel Dias Foundation - Funed, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Central Laboratory of Public Health of Minas Gerais, Ezequiel Dias Foundation - Funed, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Biotica Estudos Ambientais, João Pinheiro, MG, Brazil

^e Biochemistry and Immunology Department, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2024

Received in revised form

4 June 2024

Accepted 26 June 2024

Handling Editor: Dr B Friguet

Keywords:

Venom
Loxosceles
brown recluse spider
Antivenom
Enzymatic activities
Phospholipase D

ABSTRACT

The *Loxosceles* genus represents one of the main arachnid genera of medical importance in Brazil. Despite the gravity of *Loxosceles*-related accidents, just a handful of species are deemed medically important and only a few have undergone comprehensive venom characterization. *Loxosceles amazonica* is a notable example of a potentially dangerous yet understudied *Loxosceles* species. While there have been limited reports of accidents involving *L. amazonica* to date, accidents related to *Loxosceles* are increasing in the North and Northeast regions of Brazil, where *L. amazonica* has been reported. In this work, we provide a complementary biochemical and immunological characterization of *L. amazonica* venom, considering its most relevant enzymatic activities and its immunorecognition and neutralization by current therapeutic antivenoms. Additionally, a cDNA library enriched with phospholipase D (PLD) sequences from *L. amazonica* venom glands was built and subsequently sequenced. The results showed that *L. amazonica* venom is well immunorecognised by all the tested antibodies. Its venom also displayed proteolytic, hyaluronidase, and sphingomyelinase activities. These activities were at least partially inhibited by available antivenoms. With cDNA sequencing of PLDs, seven new putative isoforms were identified in the venom of *L. amazonica*. These results contribute to a better knowledge of the venom content and activities of a synanthropic, yet understudied, *Loxosceles* species. *In vivo* assays are essential to confirm the medical relevance of *L. amazonica*, as well as to assess its true toxic potential and elucidate its related pathophysiology.

© 2024 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

1. Introduction

Spiders of the genus *Loxosceles* belong to the *Sicariidae* family, currently represented by 149 species widely distributed around the

world [1]. *Loxosceles* spiders are relatively small animals that measure around 4 cm in diameter when adults, have brown coloration and elongated legs. Notably, they exhibit a non-aggressive behavior, and accidents typically occur when they are inadvertently pressed against the victim's body or when they perceive a threat rendering them vulnerable [2–4].

In Brazil, accidents with arachnids (scorpions and spiders) are the most numerous among reported human envenomation cases. Considering only spiders, the *Loxosceles* genus is the main

* Corresponding author. Serviço de Toxinologia Molecular, Divisão de Ciência e Inovação, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Belo Horizonte, MG, CEP: 30510-010, Brazil.

E-mail address: clara.duarte@funed.mg.gov.br (C. Guerra-Duarte).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.06.012>

0300-9084/© 2024 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Please cite this article as: R. Silva-Magalhães, A.L. Silva-Araújo, P. Peres-Damásio et al., *Loxosceles amazonica* Brown Spider venom: Insights into enzymatic activities, immunorecognition, and novel phospholipase D isoforms, Biochimie, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.06.012>

ARTICLE IN PRESS

R. Silva-Magalhães, A.L. Silva-Araújo, P. Peres-Damásio et al.

Biotimie xxx (xxxx) xxx

responsible for human accidents. The spider species traditionally considered of medical importance in Brazil are *L. gauchoi*, *L. laeta*, and *L. intermedia*, which occur in Southern Brazil, where most of the loxoscelism cases also take place. However, several other species have also been reported in the country (*L. adalaida*, *L. amazonica*, *L. anomala*, *L. cardosoi*, *L. carinhonha*, *L. chapadensis*, *L. ericsoni*, *L. hirsuta*, *L. immodesta*, *L. karstica*, *L. muriciensis*, *L. niedeguidonae*, *L. puortoi*, *L. similis*, *L. troglobia*, *L. willianilsoni*) [1,5–10]. The contribution of these other mentioned *Loxosceles* species to human accidents remains unknown, as case reports almost never identify the causative agent. In addition, only limited data about these other species' venoms are available, but they indicate that these less studied venoms present relevant toxicity as well [2,4,11–16].

After a *Loxosceles* spider bite, a series of symptoms can be presented, that range from mild local effects to severe dermonecrosis and systemic manifestations, such as fever, malaise, weakness, nausea, vomiting, hematuria, jaundice, thrombocytopenia, intravascular hemolysis, disseminated intravascular coagulation and acute kidney injury (AKI), which is the main cause of death in loxoscelism [17,18]. Up until now, it is not possible to relate specific symptoms to a particular species of *Loxosceles*. Therefore, the above-mentioned clinical manifestations can be considered for all brown spider accidents.

From the data retrieved from Brazil's Ministry of Health notification system [19], it is noticeable that the number of reported accidents caused by spiders of the *Loxosceles* genus has been increasing in all regions of Brazil since 2016, except for the South region, that has been following an opposite trend (Fig. 1A). Indeed,

in the ten-year period between 2012 and 2022, the incidence of *Loxosceles* accidents has more than doubled in the Northeast and Central West regions. A relevant increase is also noted in the North and in the Southeast, whereas in the South, the incidence has been dropping (Fig. 1B). It is important to highlight that, as the absolute number of reported cases and the prevalence of loxoscelism in all the other Brazilian regions are lower than in the Southern region (Fig. 1C), which traditionally records the highest number of cases, the national average of loxoscelism incidence has decreased. However, considering this scenario, it is crucial to understand the causes associated with the rise of *Loxosceles* accidents in some regions of Brazil and investigate whether species not commonly considered as of medical concern are linked to the growth of cases in these areas.

The presence of the species *Loxosceles amazonica* (Gertsch, 1967) has been recorded in Peru and Brazil [1]. Its Brazilian distribution comprises areas in the North, Northeast, and Midwest regions of Brazil, as well as in the north of Minas Gerais state [7,20–24]. There is only one case of cutaneous loxoscelism caused by *L. amazonica* reported in the literature [25], but loxoscelic accidents reported in areas where *L. amazonica* incidence is confirmed reveals systemic effects can be present in as much as 13.3 % of the cases [26]. Another recent article also compiled accidents with brown spiders occurring in Pernambuco state, where *L. amazonica* is also found [27]. Most of the cases described were classified as moderate or severe. However, despite its occurrence in a vast human-inhabited area where loxoscelism appears to be growing, *L. amazonica* is not currently classified among the *Loxosceles* species of medical importance in the country.

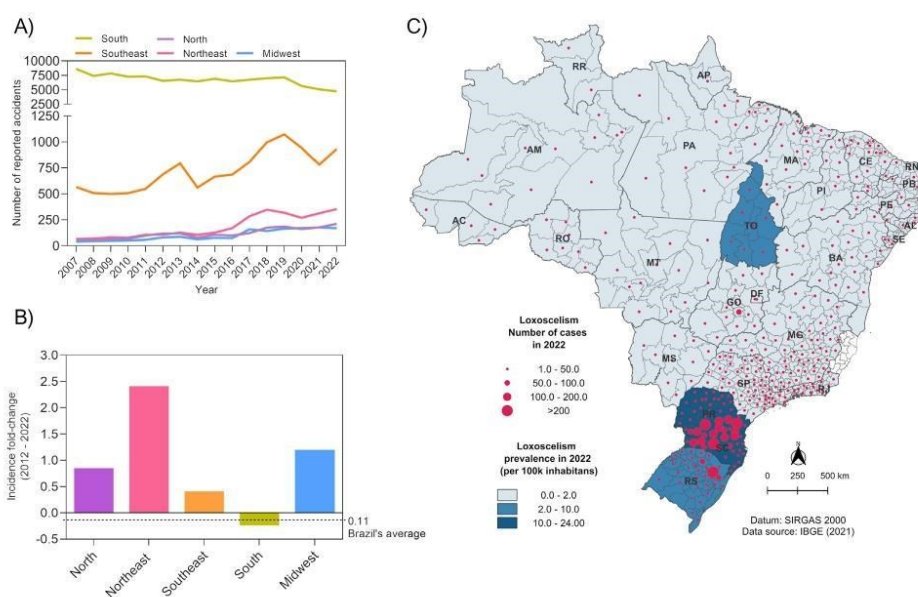


Fig. 1. - Reported *Loxosceles* sp. accidents in Brazil from 2007–2022*. A) Number of reported accidents caused by *Loxosceles* spiders between the years of 2007 and 2022 per region of Brazil. B) Fold change of incidence of *Loxosceles* accidents in ten years (2012–2022) per region. The average for Brazil is demonstrated by the dotted line. C) Map of Brazil illustrating the prevalence of *Loxosceles* accidents per federal unit in the year 2022. Color intensities correspond to incidence rates, according to the legend. Graphs were produced using GraphPad Prism 9.0 software, and the map figure was produced using QGIS software. Accidents numbers were recovered from the Sistema de Informação de Agravos de Notificação –SINAN [19]. *Data subject to revision of SINAN, 2020–2022. Data from the Southeast region does not include data from Espírito Santo state, as the state stopped providing data to SINAN since 2020.

Research from Lopes and co-workers in 2021 started to unveil the toxic potential of *L. amazonica* venom. Results showed that *L. amazonica* venom has sphingomyelinase activity (the main activity of loxoscelic venoms) and cause complement dependent hemolysis in a fashion comparable to *L. laeta* venom. On the other hand, *L. amazonica* venom was unable to affect cell viability on cultured human keratinocytes, suggesting a possible weaker toxicity compared to *L. laeta* venom [4].

Considering the potential relevance of *L. amazonica* for accidents taking place in Brazil and the limited available information concerning its venom, the present work aims to contribute to the knowledge on *L. amazonica* spider venom, performing its biochemical and immunological *in vitro* characterization, both to compare its activities with venoms from other *Loxosceles* of medical relevance in Brazil, as well as to evaluate potential inhibition by commercial antivenoms used in the treatment of accidents. We also performed the identification of novel proteoforms of PLDs within *L. amazonica* venom, unveiling some of its molecular characteristics.

2. Methodology

2.1. Spiders, venoms and antivenoms

Loxosceles amazonica specimens (Fig. 2) were collected in the locality of Serra Branca, Paraíba, Brazil (7.488769 S, 36.668485 W), with all the necessary authorizations obtained from the Brazilian Authorization and Biodiversity Information System (SISBIO) (Process numbers 21102–9 and 21102–11) and the National System for Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) (Process number A651423) by Fundação Ezequiel Dias (Funed). Subsequently, the specimens were housed and maintained in Funed's arachnidary. Venom was obtained by microdissection of the venom glands, with spiders previously anesthetized at -20°C for 3 min. A first venom extraction was performed in 42 individuals, regardless of their sex or developmental stage. In a second extraction, venoms from male ($n = 12$) and female specimens ($n = 18$) were collected separately. Then, venom glands were macerated and centrifuged for 10 min at 12,000 rpm. The supernatant was collected and stored at -80°C until use. Protein content was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad) or by an *in-house* Bradford assay [28], using bovine serum albumin as standard. For phospholipase D sequencing, the venom glands of 10 individuals, five from each sex, were extracted in RNeasy lysis buffer and further processed as described in section 2.5.1.

Anti-arachnidic antivenom (AAV) produced by Butantan Institute (São Paulo, Brazil) by horse immunization with venoms from

Loxosceles gauchus, *Phoneutria nigriventer* and *Tityus serrulatus* was a kind gift from Dr. Fernanda Portaro. Anti-loxoscelic antivenom (LAV) produced by CPPI (Center for Research and Production of Immunobiologicals of Paraná, Brazil) by immunization of horses with a pool of *Loxosceles gauchus*, *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* venoms was a kind gift from Dr. João Minozzo, who also provided *L. gauchus* venom for controls. The antielapidic antivenom (EAV), produced by the Ezequiel Dias Foundation (Funed) in Belo Horizonte, Brazil, was used as a negative control in certain experiments.

2.2. Immunoassays

2.2.1. SDS-PAGE analysis and western blot

Ten micrograms of the obtained *L. amazonica* venom (LamV) diluted in distilled water were submitted to 15 % polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and stained with Coomassie Brilliant Blue. For the Western Blot assay, a similar SDS-PAGE gel was made to be tested with each different serum. The gels were transferred overnight to a nitrocellulose membrane at 24 V, and afterwards for an hour at 48 V. After blocking the membranes with 5 % skimmed milk in PBS-Tween 0.5 %, they were incubated with different antivenoms: anti-arachnidic antivenom (AAV); anti-loxoscelic antivenom (LAV), horse serum produced by hyperimmunization with a recombinant phospholipase D (α -LiD1r) from *L. intermedia* [29], in addition to a pre-immune horse serum, in a 1:1000 dilution. The membranes were further incubated with rabbit anti-horse IgG peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000 dilution) (Bethyl) and revealed using 3,3'-diaminobenzidine-chloronaphthol substrates (Sigma).

2.2.2. Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)

The immunoreactivity of LamV with the antivenoms currently used in Brazil to treat accidents with *Loxosceles* spiders (AAV and LAV) was evaluated by ELISA. Corning 96 well plates were coated overnight with 100 μl of a solution containing 0.5 μg of either LamV or the other venoms that compose the immunization pool used to produce the antivenoms, diluted in carbonate buffer (pH 9.6). Wells were blocked with 3 % skimmed milk in PBS-Tween 0.5 %, washed with saline, and incubated for 1 h at 37°C with serial dilutions (1:1000 to 1:128,000) of either AAV or LAV antivenoms. As a negative reactivity control, non-immune horse sera were tested in the highest 1:1000 dilution with all the venoms. After washing and incubating with rabbit anti-horse IgG peroxidase-conjugated secondary antibody (Bethyl), diluted 1:10,000, wells were incubated with OPD SigmaFast substrate (Sigma) for 30 min in the dark. The reaction was stopped with H_2SO_4 30 % and absorbances were



Fig. 2. - *Loxosceles amazonica* collected specimens. Female specimen (left), male specimen (right).

ARTICLE IN PRESS

R. Silva-Magalhães, A.L. Silva-Araújo, P. Peres-Damásio et al.

Biochimie xxx (xxxx) xxx

measured at 492 nm at a Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). Results are presented as antivenom titers for each venom, which were calculated as the antivenom dilution at which the ELISA assay absorbance exceeded the non-immune sera absorbance by more than two standard deviations. Two independent experiments, each performed in duplicate, were conducted.

2.3. Enzymatic activities

2.3.1. Sphingomyelinase activity assay

Toxins from the phospholipase D family are the major component of loxoscelic venoms, and although these enzymes may act on different lipids, sphingomyelin is most often its preferred substrate [30,31]. The sphingomyelinase activity of *LamV* was determined using the Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Different venom amounts of *LamV* (0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 µg) were assayed in duplicates, by two independent experiments. *Loxosceles gaucho* venom (*LgV*) was also assayed under the same conditions for comparison. Hydrolysis of sphingomyelin was detected indirectly by measuring fluorescence in a spectrophotometer (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fischer) using excitation at 530 nm and emission detection at 590 nm. For inhibition assays, 0.25 µg of *LamV* or *LgV* were pre-incubated with 1:100 dilution of LAV for 1 h at 37 °C. The antielapitic antivenom (EAV) obtained from Fundação Ezequiel Dias (Funed) diluted 1:100 was used as a negative control. Venoms incubated with saline were used as positive control, being established as 100 % of sphingomyelinase activity.

2.3.2. Gelatinase/collagenase activity

The ability of *LamV* to degrade gelatin was determined by fluorescence in a 96-well black microtiter plate (Corning) using the EnzChek Gelatinase/Collagenase assay kit (Invitrogen). In each well, 80 µL of reaction buffer and 20 µL of DQ gelatin from pig skin conjugated with fluorescein were added. Only reaction buffer was used as negative control and Collagenase Type IV from *Clostridium histolyticum* was used as positive control of the assay. Serial dilutions of *LamV* and *LgV* (12–0.37 µg) were made in 100 µL of reaction buffer and added to the wells. The microplate was incubated at room temperature and protected from light for 24 h. Fluorescence was then measured at 495 nm for absorption and 515 nm for emission using Fluorescence Reader (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fischer). For inhibition assays, 6 µg of either *LamV* or *LgV* were pre-incubated with 1:100 dilution of LAV for 1 h at 37 °C. The anti elapitic antivenom (EAV) obtained from Fundação Ezequiel Dias (Funed) diluted 1:100 was used as a negative control. Venoms incubated with saline were used as positive control, being established as 100 % of activity. The assays were performed in duplicates. The means of the results from two independent experiments were calculated and plotted.

2.3.3. Gelatin zymograms

To access the molecular weight of *LamV* enzymes responsible for the observed proteolytic activity, a zymogram was performed using 12 % SDS-PAGE, containing 5 mg/mL of gelatin incorporated to the gel. The venoms were diluted in water under non-reducing conditions and subjected to electrophoresis for 1 h at 50V and then 100V in a refrigerated environment. The gels were washed in 2.5 % (v/v) Triton X-100 for 1 h, then incubated overnight in 1 M phosphate buffer pH 8.0 for the activity assay. For the inhibition assay, the gel was incubated overnight in 1 M phosphate buffer pH 8.0 containing metalloproteinase inhibitors (2 mM EDTA or 3 mM Phenanthroline). Gels were then stained with Coomassie blue. The

clear lysed regions of the gel against a blue colored background indicate the presence of enzymatic degradation of the incorporated substrate.

2.3.4. Hyaluronidase activity

The hyaluronidase activity of *LamV* and *LgV* were determined according to the turbidimetric method described in Ref. [32], with some modifications. Briefly, different amounts of venoms diluted in acetate buffer (0.2 M sodium acetate-acetic acid and 0.15 M NaCl, pH 6.0) were incubated with 12.5 µg of hyaluronic acid (HA) in a volume of 100 µL at 37 °C for 15 min. After the incubation period, 200 µL of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) reagent was added to the samples and the turbidity was measured spectrophotometrically at 400 nm. To determine the amount of venom required to degrade 50 % of the available HA, equivalent to 1 turbidity-reducing unit (TRU), results were plotted as concentration-response curves, and values were calculated using the GraphPad Prism 9. All assays were performed as two independent experiments in duplicate. For inhibition assays, different sera (EAV and LAV - all to 2.5 µL) were incubated with an amount of each venom equivalent to 1 TRU for 1 h at 37 °C. After incubation, the assay proceeded as previously described.

2.4. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism (version 9.0). Data normality was verified by the Shapiro-Wilk test, considering as parametric datasets with p-values higher than 0.05. Two-way ANOVA test was used to analyze data. For the gelatinase/collagenase assay, the Bonferroni multiple comparison test was used. For all the tests, values were considered significantly different when $p < 0.05$. In all the assays, samples were tested in duplicates, in at least two independent assays. Results are presented as means of the obtained values, with standard deviation.

2.5. Phospholipase D sequencing

2.5.1. RNA isolation, cDNA synthesis and amplification

Venom glands of ten adult specimens of *L. amazonica* (five males and five females) were extracted and immediately stored in RNA-later™ (ThermoFisher) at 4 °C. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Ambion, Life Technologies). First-strand cDNA was synthesized from total RNA using SMART® MMLV Reverse Transcriptase kit (Clontech) and oligo-dT primers designed by Ref. [33], targeted for annealing at the 3' end of PLDs mRNAs (5'-ggccacgcgtcgactagtactttttttttttttt-3'). Subsequently, to amplify PLD sequences from the first-strand cDNA, a PCR reaction was performed, using two degenerate forward primers: "sphing1f" (5'-tggathatggncaytggt-3') designed to match the N-terminus of sequences from this gene family [34] and "Lpara" (5'-gcncaytggtgnaaygagt-3') to match more divergent homologs of PLDs, and the reverse primer (5'-ccacgcgtcgactagtac-3') [33]. PCR reactions contained 200 ng of cDNA, 1x PCR buffer, 1 µM dNTPs, 1 µM of each primer and 1 U Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA). Cycling conditions were: 5 min at 94 °C followed by 35 cycles at 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 1 min, and a final cycle of 72 °C for 7 min. PCR products were analyzed in 1 % agarose gel.

2.5.2. PLD cDNA library construction, sequencing, assembly, and annotation

The cDNA strands related to the amplified PLDs produced was amplified with end point PCR to increase template concentration, following the Ion Plus Fragment Library Kit recommendation. PCR products were cleaned up using AmpureXP purification beads

(Beckman Coulter). Emulsion PCR was performed to amplify the library using Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific) and the Ion OneTouch 2 system (Thermo Fisher Scientific). Ion Sphere particles (ISPs) were enriched using the Ion OneTouch ES (Thermo Fisher Scientific). Enriched ISPs were sequenced using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) and the Ion PGM Hi-Q Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific), with the Ion 318 chip. All procedures above followed manufacturer's instructions. The Ion Torrent Suite Software and the FileExporter plugin were used to obtain the reads in the FASTQ format from the Ion Torrent PGM platform (ThermoFisher Scientific). The obtained sequences were assembled *de novo* using the SPAdes v 3.15.2 software and the options: -rna and -iontorrent [35,36].

After assembly, the resulting sequences were translated into amino acid sequences using the ExPASy translation tool and annotated using the BlastP tool, to identify similarities with previously described PLDs from *Loxosceles*. The most complete sequences with highest coverages obtained were selected and analyzed for the conservation and presence of essential phospholipase D elements within their sequences: residues related to Mg²⁺-ion-binding site, residues crucial for catalytic activity, and cysteines related to disulfide bridge formation. The alignment of translated PLD sequences from *L. amazonica* was performed using the Clustal Omega program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), comparing them with sequences previously annotated for *L. amazonica* (LamSicTox-alphaV1i - C0JB18, LamSicTox-alphaV1ii - C0JB19, LamSicTox-alphaV1ii - C0JB20, and LamSicTox-alphaC1 - C0JAZ9) available in the Uniprot database (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

In addition, a pairwise comparison of the obtained *L. amazonica* PLD sequences with other sequences available in UNIPROT belonging to other *Loxosceles* species of acknowledged medical concern (*L. gaucho*, *L. intermedia* and *L. laeta*) was performed using Emboss Stretcher (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/). A heatmap depicting the results was generated using Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

3. Results and discussion

Despite *Loxosceles amazonica* not being recognized as a medical importance spider species, its venom has sphingomyelinase activity and can elicit complement-dependent lysis of human erythrocytes [4]. Brown spider accidents in the geographic area of *L. amazonica* occurrence can cause necrotic skin lesions leading to potential secondary infections, coagulation abnormalities, and acute kidney damage [26]. However, the toxic potential and molecular profile of this spider's venom has only started to be studied, and a characterization of its enzymatic properties and antivenom neutralization are still lacking. Therefore, this study aims to provide additional insights into the composition of *L. amazonica* venom, encompassing *in vitro* activities, the capability of clinically employed antivenoms to identify and neutralize its primary toxins, and amplification and sequencing of PLDs, the most relevant toxin group for envenomation.

The spider specimens used in this study were collected in the residential neighborhood of Pereiros, in the small city of Serra Branca, Paraíba, Brazil, which has only 13,614 inhabitants, according to 2022 estimate by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<https://www.ibge.gov.br/>). In this locality, *L. amazonica* spiders occurs indoors and in the peridomicile, being frequent and abundant. It colonizes all types of debris in yards, especially piles of wood, bricks, and tiles, leading to frequent and direct contact of the population with the spider. Fukushima et al., 2017 [7] have also described the presence of *L. amazonica* in different states from Northeast, Brazil, but mainly the specimens were found in natural

conditions, primarily in the typical "caatinga" vegetation. We hypothesize that the species is native to natural habitats in the region and has more recently colonized urban areas, becoming synanthropic. In the city, we obtained informal reports of spider accidents by the locals. Overall, accidents seem to occur frequently in this region and appear to be underestimated. As we did not recover any other different species of the genus in Serra Branca and roundabouts, we believe that the accidents described by its citizens were caused by *L. amazonica*. Together with evidence from other reports of human loxoscelism in states from Northeast [26,27] and the increase in the reported *Loxosceles* cases in the Northeast (Fig. 1B), the information gathered in Serra Branca further justifies a more detailed study of *L. amazonica* venom and its potential toxicity.

3.1. Electrophoretic profile and immunoassays

The SDS-PAGE analysis of *L. amazonica* venom (LamV) revealed a somewhat complex composition, but typical of *Loxosceles* venoms. There are differences in the intensity of venom bands from male and female specimens, notably in the molecular weight range typical of PLD's, being more prominent in the female venom (Fig. 3A). Studies comparing the venoms of males and females of *L. intermedia* and *L. laeta* species have already reported intraspecific variation linked to sex. Females tend to show greater toxicity, as well as greater hemolytic, dermonecrotic and complement activity when compared to males [37,38]. A strong band around 70 kDa seen in both male and female venom profile can be related to hemolymph contamination due to the microdissection process, as a similar band was detected in the hemolymph of *L. intermedia* (around 66 kDa) and in the venom of *L. anomala* extracted by the same method [14,39].

The Western blot analysis (Fig. 3A) suggests that the LamV, both from males and females, are strongly recognized by therapeutic antivenoms (AAV and LAV). Bands observed around 34 kDa in the SDS-PAGE are likely to correspond to phospholipases D, which are among the primary toxic components present in *Loxosceles* venoms [40]. This is evidenced by their reactivity with specific antibodies against LiD1r (a recombinant PLD from *Loxosceles intermedia*), produced previously [29]. Notably, these bands displayed the highest reactivity with both assayed antivenoms (anti-arachnidic antivenom - AAV and anti-loxoscelic antivenom - LAV), the therapeutic serums used for the treatment of loxoscelism in Brazil.

The ELISA analysis of the antivenom antibody titers (Fig. 3B) indicates that LamV displayed reactivity with antivenoms of a magnitude comparable to the venoms currently used as immunogens for their production. For the AAV, the titer calculated for the venom from female *L. amazonica* specimens was similar to the titer obtained for *L. gaucho* venom. On the other hand, titers for *L. amazonica* males were lower, which was not observed in the Western blot analysis. However, the male *L. amazonica* venom titer was comparable to the ones obtained for the venoms from *Phonetrus nigriventer* and *Tityus serrulatus*, which are in the antigenic pool used to produce AAV. It is relevant to mention that while the venoms from both *P. nigriventer* and *T. serrulatus* are mainly composed by low molecular weight toxins [41,42], which tend to be poor immunogens, *Loxosceles* venoms have a predominance of toxins above 25 kDa, and PLDs have shown to be very potent immunogens [43]. Therefore, comparison of AAV titers among these venoms must be regarded from this perspective. For LAV, no difference was observed between the pool of *Loxosceles* venom's reactivity and either female or male *L. amazonica* venoms. The immune cross-reactivity among the main toxins of Brazilian *Loxosceles* venoms was assessed in a previous study [44]. These findings led to the conclusion that immunogenic epitopes from *Loxosceles* toxins are conserved across species, likely extending

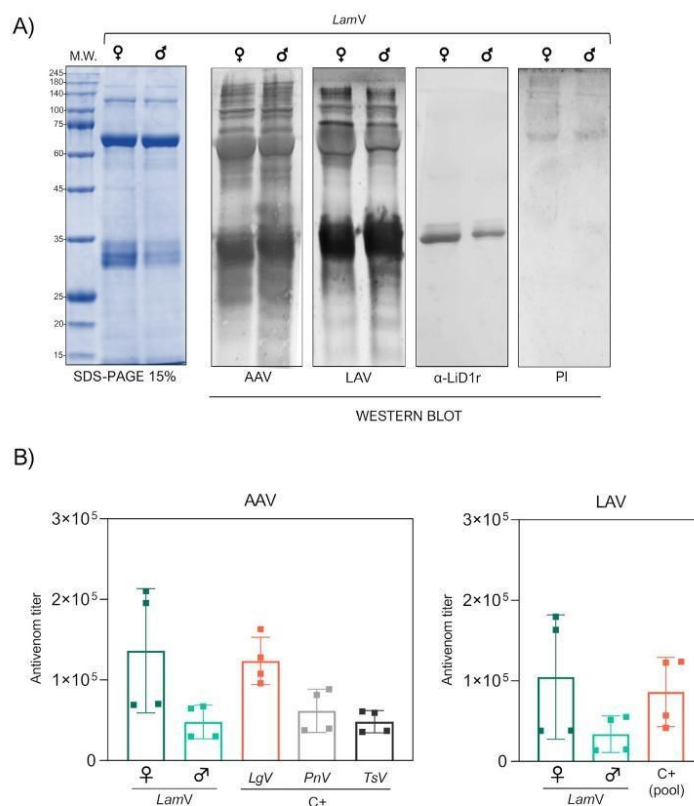


Fig. 3. *Loxosceles amazonica* venom (LaV) immunoreactivity. **A)** On the left, SDS-PAGE 15 % of 10 µg of *L. amazonica* venom, under reducing conditions. On the right, Western blot of the same venom amount probed with therapeutic antivenoms, pre-immune horse sera and experimental anti-venom protein serums. **B)** On the left, antivenom titers obtained in ELISA assays with AAV and on the right, ELISA assays with LAV. Antivenom titers were calculated for each venom, considering the specific antivenom dilution in which absorbance was higher than that obtained in the venom reaction with horse pre-immune sera, diluted 1:1,000, plus two standard deviations. M.W. – molecular weight marker. *LamV* – *Loxosceles amazonica* venom. AAV – anti-arachnidic antivenom produced by Butantan Institute. LAV – anti-loxoscelic antivenom produced by Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI). PI – horse pre-immune sera. αLiD1r – horse sera developed against recombinant *Loxosceles intermedia* dermonecrotic toxin. LgV – *Loxosceles gaucha* venom. PnV – *Phoneutria nigriventer* venom. TsV – *Tityus serrulatus* venom. C+ (pool) – mixture of equal amounts of *Loxosceles gaucha*, *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta*.

throughout the genus. This conservation mirrors the degree of amino acid residue conservation within their sequences, which likely accounts for the high reactivity of antivenoms with *L. amazonica* venom.

3.2. Enzymatic activities

The toxicity of *Loxosceles* venom primarily arises from the enzymatic activities of its components, such as phospholipases D, astacin-like metalloproteinases, and hyaluronidases [40,45,46]. To investigate the sphingomyelinase activity of *LamV*, the Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit (Invitrogen) was used, as in other *Loxosceles* venom characterization studies [47–50]. As shown in Fig. 4A, results of this assay demonstrated that *LamV* can degrade sphingomyelin in a concentration-dependent manner, albeit less efficiently than *L. gaucha* venom (LgV). Differences in activity between LgV and both male and female *LamV* were statistically different in all venom amounts tested (except between LgV and female venom at 2.0 µg). Comparative analysis revealed that

venoms from female *L. amazonica* exhibited more potent sphingomyelinase activity than those from males, consistent with observations for *L. intermedia* and *L. laeta* [38]. This difference was statistically significant with 0.5, 1.0 and 2.0 µg of venom tested. Unfortunately, there was not enough male *L. amazonica* venom to perform the subsequent experiments. In all other assays performed from now on, we used pooled *LamV* from both males and females.

Likewise, we only had access to a small aliquot of anti-arachnidic antivenom (AAV) from Butantan Institute. Therefore, enzymatic inhibition assays were performed only with anti-loxoscelic antivenom (LAV), from CPPI. The results of the sphingomyelinase activity inhibition assay (Fig. 4B) indicated that LAV inhibited only ~60 % of *LamV* activity. It is noteworthy that the inhibition of *L. gaucha* venom activity was almost complete, probably due to the inclusion of *L. gaucha* venom in the antigenic pool used to produce LAV. As most of the toxic activities observed in *Loxosceles* venoms are mediated by PLD's, the fact that these enzymes present in *LamV* are not completely neutralized by currently used antivenoms may pose a challenge for the treatment of accidents

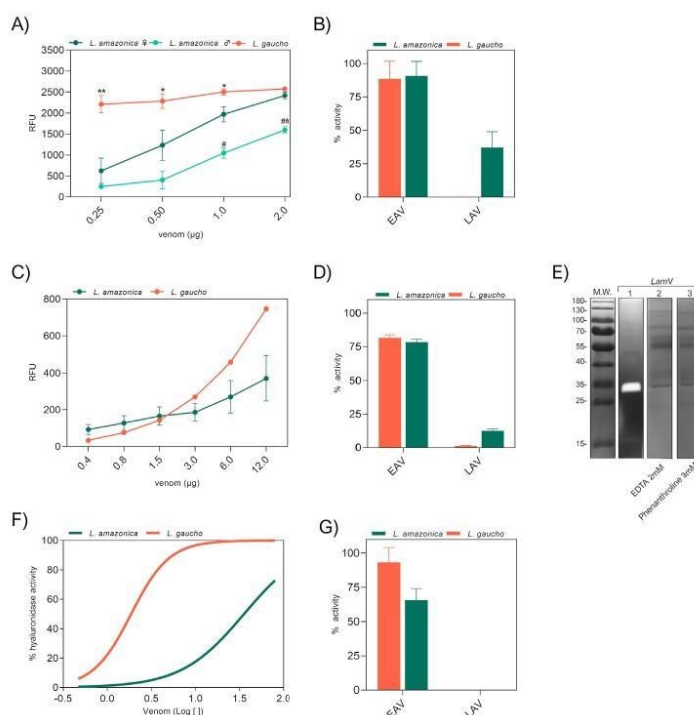


Fig. 4. Enzymatic activities and inhibition assays of *Loxosceles amazonica* venom (LamV). **A)** AmplexRed Sphingomyelinase assay (Thermo Fisher) results, using serial dilutions of *Loxosceles amazonica* (LamV) and *Loxosceles gaucho* (LgV) as a control. Results were analyzed by Two-way ANOVA and revealed statistical differences. Differences considering *L. gaucho* venom as control are marked with asterisks (*) (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; ### $p < 0.0005$). **B)** Inhibition assay of sphingomyelinase activity. Venoms (0.25 μ g) were preincubated with anti-loxoscelic antivenom (LAV), diluted 1:100, for 1 h at 37 °C. Anti-elapitic antivenom (EAV), diluted 1:100 was used as a negative control. Results are presented as % of residual sphingomyelinase activity, being venom incubated only with saline equal to 100 % activity. **C)** EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay of LamV, using serial dilutions and LgV as a control. **D)** Inhibition of EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay of venoms (6 μ g) preincubated with LAV (1:100), for 1 h at 37 °C. EAV, diluted 1:100 was used as a negative control. Results are shown as a percentage of residual collagenase activity, being venom incubated only with saline equal to 100 % activity. **E)** Zymography of LamV using 12 % SDS-PAGE, containing 5 mg/mL of gelatin incorporated to the gel. In lane 1, LamV direct activity; in lanes 2 and 3, gels were incubated overnight in 1 M phosphate buffer pH 8.0 containing metalloproteinase inhibitors (2 mM EDTA or 3 mM Phenanthroline). **F)** Hyaluronidase activity assay, performed using serial dilutions of LamV and LgV diluted in acetate buffer incubated with 2.5 μ g of HA at 37 °C for 15 min. After the incubation period, 200 μ l of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) reagent was added to the samples and the turbidity was measured spectrophotometrically at 400 nm. The venom amount needed to reduce in 50 % the produced turbidity, named Turbidity Reduction Unit (TRU) was calculated from the obtained curves. **G)** Inhibition of hyaluronidase activity assay using LAV, diluted 1:100 and preincubated with a venom amount equivalent to 1 TRU, for 1 h at 37 °C. EAV, diluted 1:100 was used as a negative control. Results are presented as % of residual hyaluronidase activity, being venom incubated only with saline equal to 100 % activity. For all tests, samples were tested in duplicates, in two independent assays. Results are presented as means of the obtained values, with standard deviation.

involving this species. The high immune cross-reaction of anti-venoms with LamV, verified in the immunoassays reported previously, seemingly contradicts the limited neutralization of venom enzymatic activities. However, this phenomenon has been observed before. Guilherme and colleagues generated four monoclonal antibodies (mAbs) against *L. gaucho* venom, some of which exhibited reactivity in ELISA with *L. intermedia* and *L. laeta* venoms. Nevertheless, the mAbs only effectively neutralized the toxic activities of *L. gaucho* [51]. The findings presented here support the notion that reactivity between toxins and antibodies in immunoassays does not necessarily translate into the neutralization of their toxic activities. This observation has direct implications for the efficacy of antivenoms in treating envenomation incidents involving species whose venoms are not represented in the immunogen used for antivenom production.

Previous works demonstrated that *Loxosceles* venoms presented

gelatinolytic proteases [45,52–56]. To further characterize the proteolytic activity of LamV, specifically its capacity to degrade gelatin/collagen, two different methods were employed. The first method used the commercial EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay kit (Invitrogen). This assay demonstrated that LamV has similar gelatinase/collagenase activity compared to the LgV, with *L. gaucho* showing greater activity at concentrations exceeding 3 μ g of venom (Fig. 4C), with statistical significance. Using the same kit, other studies have demonstrated that the gelatinolytic activity varies among three different species of *Loxosceles*. Specifically, *L. laeta* exhibited the highest level of venom proteolytic activity [57]. Moreover, prior research has suggested a correlation between the metalloprotease activity in *L. intermedia* venom and its harmful effects. This association is attributed to the breakdown of collagen, as gelatin is a byproduct of collagen [58]. A recombinant *Loxosceles* astacin-like protease (rLALP) from *L. intermedia* was produced and

was also capable of degrading gelatin, in addition to fibronectin and fibrinogen. Treatment of cultured rabbit subendothelial cells with rLALP caused the cell's detachment, suggesting that proteases in *Loxosceles* venoms may contribute to venom spreading, as they can degrade extracellular matrix components [54]. However, the exact role of proteases in *Loxosceles* venoms remains an understudied subject.

The results from the gelatinase/collagenase activity inhibition assay (Fig. 4D) revealed that LAV effectively inhibited approximately 90 % of LamV activity in the dilution tested. Incubation with EAV, used as a negative control, inhibited only around 25 % of the venoms' activities. Similar results were obtained for LgV.

A second method used to demonstrate the venom's proteolytic activity was the gelatin zymogram assay. In Fig. 4E, the presence of a clear region around 30 kDa represents enzymatic degradation by the venom, confirming proteolytic activity in the venom of *L. amazonica*. This molecular mass is compatible with *Loxosceles* Astacin-like proteases (LALPs), previously described for the genus [57]. Treatment of the gel with EDTA and Phenanthroline, both molecular inhibitors of metalloproteases, resulted in the loss of proteinases activity, showing that the observed activity is likely to be caused by this family of enzymes.

Hyaluronidases in *Loxosceles* venoms have been suggested as spreading factors that increase the diffusion of other toxins and in the gravitational spreading of dermonecrosis [46,59], thus playing an important role in cutaneous envenoming. To confirm the presence of hyaluronidases in *L. amazonica* venom, specific HYAL activity was determined and the amount of venom to achieve 50 % of HYAL activity, considered as one turbidity reducing unit (TRU), was estimated (Fig. 4C). The results show that 35.59 µg were necessary to degrade 50 % of HA in solution. For *L. gaucho*, this value was calculated as 1.87 µg, which was significantly lower.

To assess if LAV could inhibit hyaluronidase activity from *Loxosceles* venoms *in vitro*, another turbidimetric assay was performed (Fig. 4F), pre-incubating an amount equivalent to 1 TRU of each venom with 1:100 of LAV for 1 h at 37 °C. As expected, positive control and venoms pre-incubated with EAV preserved most of the venom capacity to degrade hyaluronic acid, while therapeutic loxoscelic antivenom completely inhibited HYAL activity of the venoms tested.

3.3. Phospholipase D (PLD) sequencing

To uncover potential novel PLD isoforms in *L. amazonica* venom, a cDNA library enriched for PLD sequences was constructed from venom glands and subsequently sequenced. Seven putative PLD sequences, denoted as LamPLD 1 to 7, were identified and aligned with previously reported PLDs from *L. amazonica* (Fig. 5). The sequences of LamPLDs were deposited in GenBank with accession numbers PP544128 to PP544134. These sequences share characteristic features of group II PLDs, including two pairs of cysteines [60]. However, all LamPLD sequences lack certain amino acids in the N-terminal region, attributed to the use of a forward primer employed in amplifying PLD sequences from first-strand cDNA. This primer, utilized by Binford et al. [33], was also responsible for amplifying the four PLD sequences from *L. amazonica* already deposited in UNIPROT. Additionally, LamPLD3 appears to lack residues in the C-terminal region, possibly due to assembly strategy artifacts.

Among the sequences analyzed in this study, LamPLD1 and LamPLD5 displayed a higher percentage of identity with previously described *L. amazonica* PLD sequences LamSicTox-alphaIV1i and LamSicTox-alphaC1, respectively [33], as shown in the chart in the alignment depicted in Fig. 5. Given the substantial identity levels and minimal amino acid substitutions observed, these novel

sequences can be regarded as isoforms of the previously characterized ones. It is important to note that specimens utilized in Binford et al.'s study were collected in the department of Loreto, Peru, potentially accounting for differences between the previously described isoforms and those identified in our Brazilian individuals [33]. Indeed, studies have identified significant divergence in venom between *Loxosceles* specimens collected in Peru and Brazil [48,55,61].

Important structural features of spider's PLDs already established in several studies [62–66] were evaluated in the LamPLD sequences obtained. The residues' numbering followed the standardization proposed in these articles. Residues involved in Mg+2 ion coordination (E32, D34 and D91, highlighted in green) are conserved in all sequences, as well as the four cysteines typical of group II PLDs (highlighted in yellow) and the two catalytic histidines (H12 and H47, highlighted in red).

Most of the residues related the hydrogen bond network needed for catalytic activity (D52, W230, D233 and N252, highlighted in black) are also conserved, but it is noteworthy that LamPLD1 have an aspartate in position 233 instead a glutamate, similar to the previously deposited sequences LamSicTox-alphaIV1i, LamSicTox-alphaIV1ii and LamSicTox-alphaIV1ii. This conservative mutation has already been described in a PLD isoform (LiRecDT7) from *L. intermedia* venom [67]. Although both amino acids are charged, Asp (D) is smaller and less flexible than Glu (E) when positioned within the core of a protein, which can affect the stabilization of the active site. Nevertheless, this D/E mutation did not seem to abolish the biological typical activities of PLDs, as LiRecDT7 was able to degrade sphingomyelin, induces dermonecrosis and causes direct hemolysis in human erythrocytes venom [67].

Residues related to substrate binding (K93, W230 and Y228, highlighted in grey) are conserved in all sequences. Vuitika et al., 2016 demonstrated that specially Y228 is essential for biochemical, cellular, and *in vivo* activities of PLDs [64]. Moreover, this work describes that isoforms containing an additional tyrosine at the subsequent position (Y229) present high phospholipid hydrolytic activity, and induce hemolysis and dermonecrosis. LamPLDs 1, 3, 4 and 5 present this feature, but LamPLD2 have a valine in this position and LamPLD6 and 7 have a phenylalanine. *L. intermedia* PLD isoforms that contain a Y229T substitution shows only residual catalytic activity, highlighting that this residue may also play an important role [68,69]. As the Y229F substitution presented by LamPLD6 and 7 maintains the aromatic side chain in this position, it is possible that the enzyme activity is also sustained. The effect of the Y229V mutation present in LamPLD2 is more unclear. Experimental assays may be needed for confirming the biological meaning of both these substitutions observed in the here-described PLDs.

According to Moutoussamy et al., 2022 [66], PLDs with high sphingomyelinase activity, classified as pertaining to the α -clade, possess a series of conserved aromatic residues (Y44, Y46, W60 and Y62), forming an aromatic cage, which would be important for PLDs to bind lipid bilayers containing choline headgroups, playing a major role in lipid specificity. Observing the here-obtained sequences, we verified that the whole aromatic cage is conserved in LamPLDs 1, 2 and 5. In LamPLD 6 and 7, Y62 is substituted by an asparagine, which is a polar residue. Moutoussamy et al.'s work demonstrated by molecular dynamics simulations that PLD Li_αIII1, an isoform that present W60 and lacks Y62, have an equivalent cage in its structure that can behave similarly. However, in addition to this substitution, LamPLD6 and 7 also have a substitution for phenylalanine in position 46. Although it is also an aromatic residue, it is unclear whether how it can affect the affinity of these PLD isoforms for choline-containing lipids. On the other hand, LamPLDs 3 and 4 lacks completely this aromatic cage, being all the residues

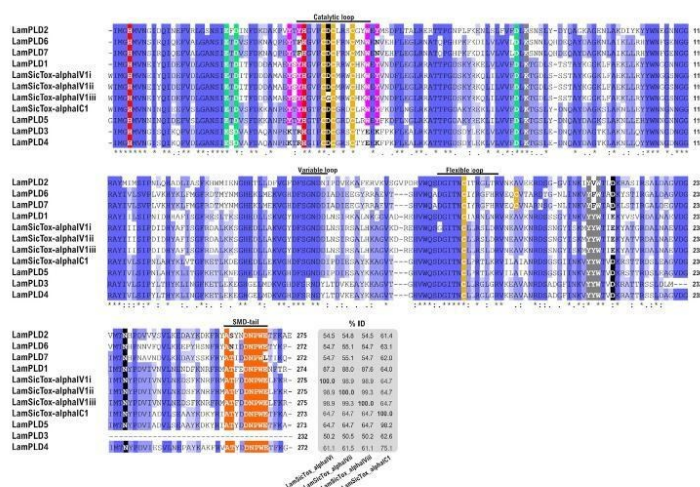


Fig. 5. Alignment of PLD sequences of *Loxosceles amazonica*. Alignment of eight sequences (LampLD 1–8), obtained in the present work with four other sequences already deposited in UNIPROT (C0JB18, C0JB19, C0JB20, C0JAZ9) using Clustal Omega. The degree of amino acid conservation is shown in different shades of blue. Catalytic histidines are highlighted in red. Important residues of the Mg^{2+} ion coordination are highlighted in green. Residues important for hydrogen bonding necessary to catalytic activity are shown in black. Cysteines related to disulfide bridge formation are shown in yellow. Residues responsible for substrate binding and orientation are shown in grey. Aromatic residues that compose an aromatic cage described by Moutoussamy et al., 2022 are highlighted in magenta. Residues from the conserved SMD-tail are signaled in orange. The percentage of similarity of the new PLD sequences with the described ones was estimated using the pairwise sequence alignment tool EMBOSST Stretcher and are depicted in the end of the sequence alignment.

substituted for charged residues (Y44K, Y46R, Y62K and W60E). This indicates that these isoforms may have specificity for substrates other than choline-containing lipids, such as the ones containing ethanolamine head groups, preferred by β -clade PLDs. However, this same work from Moutoussamy et al. discussed that PLDs from the β -clade that lacks the aromatic cage have a flexible loop richer in aspartate residues. This feature is not present in LampLD3 and 4, making it uncertain whether these isoforms can be compared.

Cordes and Binford (2006) [70] identified a conserved motif (ATXXDNPW) at the C-terminal region of phospholipases D from *Loxosceles* and sphingomyelinases from *Corynebacteria*, termed SMD-tail, or “plug” motif (indicated in orange in Fig. 5). This motif is believed to play a role in stabilizing the barrel structure typical of these toxins and may influence their function [71]. Indeed, mutations at D277 and W280 of LiD1 from *L. intermedia* have shown to potentially increase its enzymatic and biological activities [72]. LampLD2 and LampLD6 sequences exhibit substitutions in the threonine within the SMD-tail and LampLD7 have a leucine instead of a glutamate at the end of the tail. Although the substituted amino acids also possess polar side chains (serine (S) in LampLD2 and asparagine (N) in LampLD6), it is unclear whether these alterations may confer distinct properties to these PLD isoforms.

To delve deeper into the analysis of similarities and compare sequences obtained of PLD from *L. amazonica* with those of other medically significant species in Brazil (*L. gaucho*, *L. intermedia*, and *L. laeta*), we constructed a heatmap based on the degree of similarity between them (Fig. 6). The color intensity in the heatmap reflects the sequence similarity, with warmer colors indicating higher degrees of resemblance.

Phospholipases D (PLDs) represent a relatively conserved group of toxins; however, *Loxosceles* venoms are known to harbor several distinct isoforms of PLDs within a single species venom [33]. The

eight sequences derived from *L. amazonica* exhibited an average similarity of 77.6 % among them. When compared to PLD sequences obtained from UNIPROT, this similarity remains consistent within the same range (76.7 %) for other previously described *L. amazonica* sequences, but decreases to 74.4 % with *L. gaucho*, 67.5 % with *L. intermedia*, and 66.0 % with *L. laeta*. These findings underscore notable divergences between PLD sequences from *L. amazonica* and those from other medically significant Brazilian species.

L. amazonica has historically been classified in a distinct phylogenetic group from *L. laeta*, *L. gaucho*, and *L. intermedia*, as proposed by Gertsch in 1967. More recent studies have suggested a closer relationship between *L. amazonica* and the ‘*rufescens*’ group, which comprises Old World *Loxosceles* species [73,74]. Nevertheless, the exact origins of *L. amazonica* and its evolutionary relationship with other *Loxosceles* species remain subject to debate [7]. Therefore, the discovery of new PLD isoforms in *L. amazonica* venom not only significantly enhances our understanding of the diversity and molecular functioning of these enzymes but also sheds light on the evolutionary history of this species.

4. Conclusions

Loxosceles amazonica spider, a synanthropic species, inhabits regions experiencing a surge in loxoscelism cases in recent years. While previous studies have shed light on the venom and its activities to some extent, a deeper understanding of this spider's venom is needed, as *L. amazonica* is possibly accountable for harmful accidents occurring in different regions of Brazil.

Our research has revealed significant insights into the venom of *L. amazonica*, highlighting the presence of key enzymes including phospholipases D, astacin-like metalloproteinases, and hyaluronidases, all pivotal in venom toxicity. While clinically used antivenoms exhibit reactivity with the venom, their capacity to fully

ARTICLE IN PRESS

R. Silva-Magalhães, A.L. Silva-Araújo, P. Peres-Damásio et al.

Biotomie xxx (xxxx) xxx

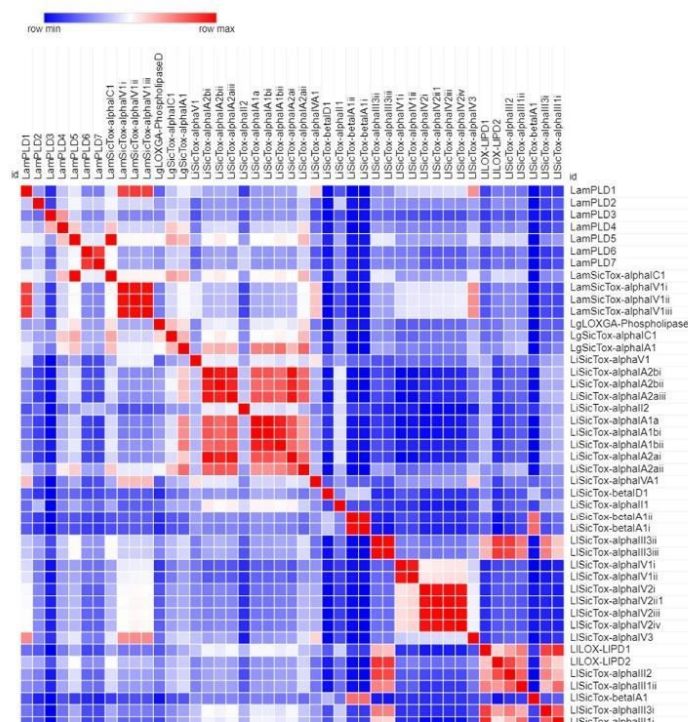


Fig. 6. Heatmap generated with MORPHEUS, depicting the similarity between *L. amazonica* and sequences from other Brazilian *Loxosceles* species using EMBOSS Stretcher. The color scale ranges from blue (low similarity) to red (high similarity), indicates the level of log two-fold change.

neutralize *L. amazonica* venom enzymatic activities is limited, potentially complicating treatment of envenomation by this species.

Furthermore, the construction and analysis of a cDNA library for phospholipases D unveiled new isoforms, contributing to a broader comprehension of these toxins' diversity. Despite these contributions, further *in vivo* and multi-omics studies are warranted to unravel more about venom composition and elucidate the pathophysiology of *L. amazonica* venom. Such endeavors are crucial for a comprehensive understanding of its true toxic potential and medical implications.

Funding

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (Process: APQ-01663-22), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq) (Process: 406163/2018-9 and INCT-INOVATOX, grant no. 406816/2022-0), and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil - CAPES (Program COFECUB Process: 88881.191812/2018-01).

CRediT authorship contribution statement

Rafaela Silva-Magalhães: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Ana Luiza Silva-**

Araújo: Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Pamella Peres-Damásio:** Investigation, Formal analysis, Data curation. **Elaine Henriques Teixeira Pereira:** Supervision, Methodology, Investigation. **Ramon de Oliveira Souza:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision. **Luana Silveira da Rocha Nowicki Varela:** Writing – review & editing, Resources, Methodology, Conceptualization. **Luiz Marcelo Ribeiro Tomé:** Writing – review & editing, Formal analysis, Data curation. **Felipe Campos de Melo Iani:** Writing – review & editing, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Adriano Lima Silveira:** Writing – review & editing, Resources, Conceptualization. **Márcia Helena Borges:** Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition. **Raissa Medina-Santos:** Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Carlos Chavez-Olortegui:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Funding acquisition, Conceptualization. **Marcelo Ribeiro Vasconcelos Diniz:** Methodology, Conceptualization. **Ana Luiza Bittencourt Paiva:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Clara Guerra-Duarte:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the Writing process

During the preparation of this work, the author(s) used ChatGPT to review English grammar, as non-native English speakers. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank Nelman Penteado for her valuable contribution to the maintenance of the spider specimens used in this work. We would also like to thank Dr. Fernanda Portaro, from Butantan Institute, and Dr. João Carlos Minozzo, from Centro de Produção e Pesquisa em imunobiológicos (CPPI), for their kind donation of antivenoms.

References

- [1] Natural History Museum Bern, World spider catalogue - version 25.0. <http://wsc.nmbe.ch>, 2024.
- [2] M. Chatzaki, C.C. Horta, M.O. Almeida, N.B. Pereira, T.M. Mendes, C. Dias-Lopes, G. Guimarães, L. Moro, C. Chávez-Olortegui, M.C.R. Horta, E. Kalapothakis, Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom, *Toxicon* 60 (2012) 21–30, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.007>.
- [3] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M. Helena Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism, *Toxicon* 44 (2004) 693–709, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>.
- [4] P.H. Lopes, C.S. Fukushima, R. Shoji, R. Bertani, D.V. Tambourgi, Searching for the toxic potential of *Loxosceles amazonica* and *Loxosceles willianilsoni* spiders' venoms, *Toxicon* 191 (2021) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.006>.
- [5] R. Bertani, C.S. Fukushima, R.H. Nagahama, *Loxosceles chapadensis* (Araneae: Sicariidae): a new recluse spider species of the gaucho group from Brazil, *J. Arachnol.* 38 (2010) 364–367, <https://doi.org/10.1636/A09-92.1>.
- [6] R. Bertani, D.M. von Schimonsky, J.E. Gallão, M.E. Bichuette, Four new troglomorphic species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832: contributions to the knowledge of recluse spiders from Brazilian caves (Araneae, Sicariidae), *ZooKeys* 806 (2018) 47–72, <https://doi.org/10.3897/zookeys.806.27404>.
- [7] C.S. Fukushima, R.M.G. de Andrade, R. Bertani, Two new Brazilian species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 with remarks on *amazonica* and *rufescens* groups (Araneae, Sicariidae), *ZooKeys* 667 (2017) 67–94, <https://doi.org/10.3897/zookeys.667.11369>.
- [8] R. Gonçalves-de-Andrade, R. Bertani, R. Hiroaki Nagahama, M.F. Ribeiro Barbosa, *Loxosceles niedeguidonae* (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region, *ZooKeys* 175 (2012) 27–36, <https://doi.org/10.3897/zookeys.175.2259>.
- [9] E. Marques-da-Silva, M.L. Fischer, Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae: Sicariidae) no Estado do Paraná, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (2005) 331–335, <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000400010>.
- [10] M.F.V.R. Souza, R.L. Ferreira, A new highly troglomorphic *Loxosceles* (Araneae: Sicariidae) from Brazil, *Zootaxa* 4438 (2018), <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4438.3.9>.
- [11] F. Bucarechi, E.M. De Capitani, S. Hyslop, R. Sutti, T.A.A. Rocha-e-Silva, R. Bertani, Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles anomala*, *Clin. Toxicol.* 48 (2010) 764–765, <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.502123>.
- [12] H.G. Leal, B.B.R. de Oliveira Mendes, C.C.R. Horta, N.B. Pereira, D.S.M. Ferreira, T.S. da Silva, G.L. Biscoto, Y. Kalapothakis, R.A. Machado de Avila, C. Chávez-Olortegui, E. Kalapothakis, Molecular cloning and functional characterization of recombinant Loxtox from *Loxosceles similis* venom, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 1112–1123, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2020.07.190>.
- [13] B.B.R. de Oliveira-Mendes, M. Chatzaki, D.F. Sales-Medina, H.G. Leal, R. van der Veer, G.L. Biscoto, P.M. Gonçalves, T. Soares da Silva, C. Guerra-Duarte, E. Kalapothakis, C.C.R. Horta, From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: an overview focused on *Loxosceles similis*, *Toxicon* 173 (2020) 5–19, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.11.002>.
- [14] P. Peres-Damásio, R. Silva-Magalhães, A.L. Silva-Araújo, E.H.T. Pereira, A.L. Silveira, L.S. da R.N. Varella, M.H. Borges, C. Chavez-Olortegui, A.L.B. Paiva, C. Guerra-Duarte, Partial characterization of *Loxosceles anomala* (Mello-Leitão, 1917) venom: a brown spider of potential medical concern, *Toxicon* 228 (2023) 107107, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107107>.
- [15] F. Pretel, R.M. Gonçalves-de-Andrade, F.C. Magnoli, M.E.R. da Silva, J.M.C. Ferreira, C.W. van den Berg, D.V. Tambourgi, Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas, *Toxicon* 45 (2005) 449–458, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.002>.
- [16] F.G. Silvestre, C.S. de Castro, J.F. de Moura, M.S. Giusta, M. De Maria, E.S.S. Alvares, F.C.F. Lobato, R.A. Assis, L.A. Gonçalves, I.C. Gubert, C. Chávez-Olortegui, E. Kalapothakis, Characterization of the venom from the Brazilian Brown spider *Loxosceles similis* moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae), *Toxicon* 46 (2005) 927–936, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.002>.
- [17] H. Schenone, T. Saavedra, A. Rojas, F. Villarreal, Loxoscelismo en Chile: estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 31 (1989) 403–415, <https://doi.org/10.1590/S0036-46651989000600007>.
- [18] U.M. Sezerino, M. Zannin, L.K. Coelho, J. Gonçalves, M. Grando, S.G. Mattosinho, J.L. Costa Cardoso, V.R. von Eickstedt, F.O. Siqueira França, K.C. Barbaro, H.W. Fan, A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92 (1998) 546–548, [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90909-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90909-9).
- [19] Ministério da Saúde - Governo Federal, Brasil, Portal da Saúde, Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN, 2024. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defltohtm.exe?sinanet/cnw/animais1r.def>.
- [20] R. Azevedo, P.M.D.S. Teixeira, R.C.L. Siqueira, A.D. Brescovit, New record and distribution of *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae: Sicariidae) in the state of Ceará, Brazil, *Check List* 10 (2014) 207, <https://doi.org/10.15560/10.1.207>.
- [21] M.Q. Almeida, L. Salvatierra, T.G. Carvalho, F.J. Prestes, A.D. Brescovit, T.R. Gasnier, Long time not seen: expanding the records of *Loxosceles amazonica* (Araneae: Sicariidae) in the Amazonas state, Brazil, *Acta Amazonica* 47 (2017) 163–166, <https://doi.org/10.1590/1809-4392201602592>.
- [22] A.L. Silveira, New geographic records of the brown spider *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Sicariidae) in Northeastern Brazil and its medical importance, *Revista Médica de Minas Gerais* 25 (2015), <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20150008>.
- [23] H.N. Albuquerque, A.R. Barbosa, I.C.S. Albuquerque, I.R. Menezes, Registro de *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Sicariidae) no Cariri Paraibano, vol. 5, *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 2004.
- [24] A.L. Silveira, M.N.A. de Souza, First record of the brown-spider *Loxosceles amazonica* (Araneae, Sicariidae) in Minas Gerais state, Brazil, *GERAIS: Revista de Saúde Pública Do SUS/MG* 4 (2017) 137–140.
- [25] S.M. Lucas, J.L. Cardoso, A. Cicarelli, Loxoscelismo: relato de um acidente humano atribuído a *Loxosceles amazonica* Gertsch 1967 (Araneae, Scytodidae, Loxoscelinae), *Mem. Inst. Butantan (Sao Paulo)* 47 (1983) 127.
- [26] P.L.M.M. Albuquerque, L.D. Tessarolo, F.H. Menezes, T.B. de Lima, J.H.H.G.L. Paiva, G.B. da Silva Júnior, A.M.C. Martins, E. de F. Daher, Acute kidney injury due to systemic loxoscelism: a cross-sectional study in Northeast Brazil, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 51 (2018) 695–699, <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0465-2017>.
- [27] M.L.P. Amorim, D.G. de O. Simão, J.P.V. e S. de Albuquerque, B.M.T. Ramos, G.J.L. do Nascimento, M.J.G. de Mello, Brown spiders (*Loxosceles*) are taking hold in Pernambuco, Brazil: a case series, 2018–2022, *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 33 (2024), <https://doi.org/10.1590/s2237-96222024v33e2023568.en>.
- [28] C.L. Kielkopf, W. Bauer, L.L. Urbatsch, Bradford assay for determining protein concentration, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2020 (2020), <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>.
- [29] C.G. Duarte, C. Bonilla, G. Guimarães, R.A. Machado de Avila, T.M. Mendes, W. Silva, B. Tintaya, A. Yarleque, C. Chávez-Olortegui, Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant demonecrotic protein of Brazilian *Loxosceles* intermedia spider neutralize lethal effects of *Loxosceles laeta* venom from Peru, *Toxicon* 93 (2015) 37–40, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.023>.
- [30] D.M. Lajoie, S.A. Roberts, P.A. Zobel-Thropp, J.L. Delahaye, V. Bandarian, G.J. Binford, M.H.J. Cordes, Variable substrate preference among phospholipase D toxins from sicariid spiders, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 10994–11007, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.636951>.
- [31] D. Chaves-Moreira, L.H. Gremski, F.R. de Moraes, L. Vuitika, A.C.M. Wille, J.E. Hernández González, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, R.K. Arni, S.S. Veiga, Brown spider venom phospholipase-D activity upon different lipid substrates, *Toxins* 15 (2023) 109, <https://doi.org/10.3390/toxins15020109>.
- [32] C. Guerra-Duarte, C.C. Rebello Horta, B.B. Ribeiro Oliveira-Mendes, B. de Freitas Magalhães, F. Costal-Oliveira, S. Stransky, C. Fonseca de Freitas, D. Campolina, P. Pereira de Oliveira Parda, R. Lira-da-Silva, R.A. Machado de Avila, E. Kalapothakis, C. Chávez-Olortegui, Determination of hyaluronidase activity in *Tityus* spp. Scorpion venoms and its inhibition by Brazilian antivenoms, *Toxicon* 167 (2019) 134–143, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.019>.
- [33] G.J. Binford, M.R. Bodner, M.H.J. Cordes, K.L. Baldwin, M.R. Rynerson, S.N. Burns, P.A. Zobel-Thropp, Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms, *Mol. Biol. Evol.* 26 (2008) 547–566, <https://doi.org/10.1093/molbev/msn274>.

- [34] G.J. Binford, M.H.J. Cordes, M.A. Wells, Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure, *Toxicon* 45 (2005) 547–560, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.11.011>.
- [35] E. Bushmanova, D. Antipov, A. Lapidus, A.D. Pribelski, rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data, *GigaScience* 8 (2019), <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz100>.
- [36] A. Pribelski, D. Antipov, D. Meleshko, A. Lapidus, A. Korobeynikov, Using SPAdes de novo assembler, *Curr Protoc Bioinformatics* 70 (2020), <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>.
- [37] K.C. de Oliveira, R.M. Gonçalves de Andrade, A.L. Giusti, W.D. da Silva, D.V. Tambourgi, Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms, *Toxicon* 37 (1999) 217–221, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00130-5).
- [38] K.C. de Oliveira, R.M. Gonçalves de Andrade, R.M.F. Piazza, J.M.C. Ferreira, C.W. van den Berg, D.V. Tambourgi, Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation, *Toxicon* 45 (2005) 421–429, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.022>.
- [39] A.V. Bednaski, D. Trevisan-Silva, F.H. Matsubara, M. Boia-Ferreira, M.M. Oliveira, L.H. Gremski, R.P. Cavaleiro, D.M.B. De Paula, E.J. Paredes-Gamero, H.K. Takahashi, M.S. Toledo, H.B. Nader, S.S. Veiga, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, Characterization of Brown spider (*Loxosceles intermedia*) hemolymph: cellular and biochemical analyses, *Toxicon* 98 (2015) 62–74, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.008>.
- [40] D.V. Tambourgi, F.C. Magnoli, C.W. van den Berg, B.P. Morgan, P.S. de Araujo, E.W. Alves, W.D. da Silva, Sphingomyelinases in the venom of the Spider-*Loxosceles intermedia* Are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 366–373, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9474>.
- [41] M.R.V. Diniz, A.L.B. Paiva, C. Guerra-Duarte, M.Y. Nishiyama, M.A. Mudadu, U. de Oliveira, M.H. Borges, J.R. Yates, I. de L. Junqueira-de-Azevedo, An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches, *PLoS One* 13 (2018) e0200628, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200628>.
- [42] Y. Kalapothakis, K. Miranda, A.H. Pereira, A.S.A. Witt, C. Marani, A.P. Martins, H.G. Leal, E. Campos-Júnior, A.M.C. Pimenta, A. Borges, C. Chávez-Orlortegui, E. Kalapothakis, Novel components of *Tityus serrulatus* venom: a transcriptomic approach, *Toxicon* 189 (2021) 91–104, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.11.001>.
- [43] L.H. Gremski, F.H. Matsubara, N.L.C. Polli, B.C. Antunes, P.H. de C. Schluga, H.C. da Justa, J.C. Minozzo, A.C.M. Wille, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, Prospective use of Brown spider venom toxins as therapeutic and biotechnological inputs, *Front. Mol. Biosci.* 8 (2021), <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.706704>.
- [44] D.R. Buch, F.N. Souza, G.O. Meissner, A.M. Morgon, L.H. Gremski, V.P. Ferrer, D. Trevisan-Silva, F.H. Matsubara, M. Boia-Ferreira, Y.B. Sade, D. Chaves-Moreira, W. Gremski, S.S. Veiga, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity, *Toxicon* 108 (2015) 154–166, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.041>.
- [45] D. Trevisan-Silva, L.H. Gremski, O.M. Chaim, R.B. da Silveira, G.O. Meissner, O.C. Mangili, K.C. Barbaro, W. Gremski, S.S. Veiga, A. Senff-Ribeiro, Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*), *Biochimie* 92 (2010) 21–32, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.10.003>.
- [46] V.P. Ferrer, T.L. de Mari, L.H. Gremski, D. Trevisan Silva, R.B. da Silveira, W. Gremski, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, H.B. Nader, S.S. Veiga, A novel hyaluronidase from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from Cloning to Functional Characterization, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 7 (2013) e2206, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002206>.
- [47] G.J. Binford, M.A. Wells, The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogynae spiders, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 135 (2003) 25–33, [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00045-9).
- [48] G. Guimarães, C. Dias-Lopes, C.G. Duarte, L. Felicioni, R.A. Machado de Avila, L.F.M. Figueiredo, J. de Moura, B.T. Faleiro, J. Barro, K. Flores, W. Silva, B. Tintaya, A. Yarleque, C. Bonilla, E. Kalapothakis, C.E. Salas, C. Chávez-Orlortegui, Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: Neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms, *Toxicon* 70 (2013) 90–97, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.018>.
- [49] A. Olvera, B. Ramos-Cernillo, J. Estévez, H. Clement, A. de Roodt, J. Paniagua-Solis, H. Vázquez, A. Zavaleta, M. Salas Arruz, R.P. Stock, A. Alagón, North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens, *Toxicon* 48 (2006) 64–74, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.010>.
- [50] E. Planas, P.A. Zobel-Thropp, C. Ribera, G. Binford, Not as docile as it looks? *Loxosceles* venom variation and loxoscelism in the Mediterranean Basin and the Canary Islands, *Toxicon* 93 (2015) 11–19, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.005>.
- [51] P. Guilherme, I. Fernandes, K.C. Barbaro, 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* 39 (2001) 1333–1342, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00085-X).
- [52] S.S. Veiga, R.B. da Silveira, J.L. Dreyfuss, J. Haoach, A.M. Pereira, O.C. Mangili, W. Gremski, Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Toxicon* 38 (2000) 825–839, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00197-X).
- [53] R.B. da Silveira, J.F. dos Santos Filho, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, H.B. Nader, C.P. von Dietrich, Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders, *Toxicon* 40 (2002) 815–822, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00078-8).
- [54] R.B. da Silveira, A.C.M. Wille, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, C.R.C. Franco, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Biochem. J.* 406 (2007) 355–363, <https://doi.org/10.1042/BJ20070363>.
- [55] R. Medina-Santos, C. Guerra-Duarte, S. de Almeida Lima, F. Costa-Oliveira, P. Alves de Aquino, A. Oliveira do Carmo, C.B. Freyreira, E.E. Gonzalez-Kozlova, E. Kalapothakis, C. Chávez-Orlortegui, Diversity of astacin-like metalloproteases identified by transcriptomic analysis in Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom and in vitro activity characterization, *Biochimie* 167 (2019) 81–92, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.08.017>.
- [56] L. Feitoso, W. Gremski, S.S. Veiga, M.C.Q.B. Elias, E. Graner, O.C. Mangili, R.R. Brentani, Detection and characterization of metalloproteases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Toxicon* 36 (1998) 1039–1051, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00083-4).
- [57] D. Trevisan-Silva, A.V. Bednaski, L.H. Gremski, O.M. Chaim, S.S. Veiga, A. Senff-Ribeiro, Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches, *Toxicon* 76 (2013) 11–22, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.065>.
- [58] S.S. Veiga, V.C. Zanetti, A. Braz, O.C. Mangili, W. Gremski, Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (2001) 843–850, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000700002>.
- [59] J.M. Futrell, *Loxoscelism*, *Am. J. Med. Sci.* 304 (1992) 261–267, <https://doi.org/10.1097/0000441-199210000-00008>.
- [60] P.O. de Giuseppe, A. Ullah, D.T. Silva, L.H. Gremski, A.C.M. Wille, D. Chaves Moreira, A.S. Ribeiro, O.M. Chaim, M.T. Murakami, S.S. Veiga, R.K. Arni, Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409 (2011) 622–627, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.053>.
- [61] R. Medina-Santos, T.G. Fernandes Costa, T.C. Silva de Assis, Y. Kalapothakis, S. de Almeida Lima, A.O. do Carmo, E.E. Gonzalez-Kozlova, E. Kalapothakis, C. Chávez-Orlortegui, C. Guerra-Duarte, Analysis of NGS data from Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom gland reveals toxin diversity, *Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genomics Proteomics* 43 (2022) 101017, <https://doi.org/10.1016/j.cb.2022.101017>.
- [62] M.T. Murakami, M. Freitas Fernandes-Pedrosa, S.A. de Andrade, A. Gabdoulkhakov, C. Betzel, D.V. Tambourgi, R.K. Arni, Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342 (2006) 323–329, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.123>.
- [63] S.A. de Andrade, M.T. Murakami, D.P. Cavalcante, R.K. Arni, D.V. Tambourgi, Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom, *Toxicon* 47 (2006) 380–386, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.005>.
- [64] L. Vuitika, D. Chaves-Moreira, I. Caruso, M.A. Lima, F.H. Matsubara, M.T. Murakami, H.K. Takahashi, M.S. Toledo, M.A. Coronado, H.B. Nader, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, R.K. Arni, S.S. Veiga, Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1861 (2016) 970–979, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.05.009>.
- [65] R. Masood, K. Ullah, H. Ali, I. Ali, C. Betzel, A. Ullah, Spider's venom phospholipases D: A structural review, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 1054–1065, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.09.081>.
- [66] E.E. Moutoussamy, Q. Waheed, G.J. Binford, H.M. Khan, S.M. Moran, A.R. Eitel, M.H.J. Cordes, N. Reuter, Specificity of *Loxosceles* α clade phospholipase D enzymes for choline-containing lipids: Role of a conserved aromatic cage, *PLoS Comput. Biol.* 18 (2022) e1009871, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009871>.
- [67] L. Vuitika, L.H. Gremski, M.R. Belisário-Ferrari, D. Chaves-Moreira, V.P. Ferrer, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 2479–2492, <https://doi.org/10.1002/jcb.24594>.
- [68] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, J.L. Dreyfuss, L. Toma, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, W. Gremski, Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization, *Biochimie* 89 (2007) 289–300, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.002>.
- [69] R. Bertoni da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, J.L. Dreyfuss, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland, *Biochimie* 88 (2006) 1241–1253, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.008>.
- [70] M.H.J. Cordes, G.J. Binford, Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria, *Bioinformatics* 22 (2006) 264–268, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti008>.

ARTICLE IN PRESS

R. Silva-Magalhães, A.L. Silva-Araújo, P. Peres-Damásio et al.

Biochimie xxx (xxxx) xxx

- doi.org/10.1093/bioinformatics/bti811.
- [71] C. Dias-Lopes, I.A.P. Neshich, G. Neshich, J.M. Ortega, C. Granier, C. Chávez-Olortegui, F. Molina, L. Felicori, Identification of New Sphingomyelinases D in Pathogenic Fungi and Other Pathogenic Organisms, *PLoS One* 8 (2013) e79240, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079240>.
 - [72] L.C. Cunha, L.P. Barreto, V.S. Valadares, C.F.B. Oliveira, L. Vuitika, M.P. Vilela, E.A. Cino, A.H. de M. Silva, R.A.P. Nagem, C. Chávez-Olortegui, C. Dias-Lopes, F. Molina, L. Felicori, The C-terminal mutation beyond the catalytic site of brown spider phospholipase D significantly impacts its biological activities, *Biochimie* 211 (2023) 122–130, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.03.010>.
 - [73] G.J. Binford, M.S. Callahan, M.R. Bodner, M.R. Rynerson, P.B. Núñez, C.E. Ellison, R.P. Duncan, Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance, *Mol. Phylogenet. Evol.* 49 (2008) 538–553, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.08.003>.
 - [74] R.P. Duncan, M.R. Rynerson, C. Ribera, G.J. Binford, Diversity of *Loxosceles* spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the *Loxosceles rufescens* lineage, *Mol. Phylogenet. Evol.* 55 (2010) 234–248, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.026>.