

FRANCISCO GABRIEL MÜLLER FERRO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (LiRecDT1) DO VENENO DE
ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia* SOBRE FIBRAS ELÁSTICAS**

PONTA GROSSA

2024

FRANCISCO GABRIEL MÜLLER FERRO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (LiRecDT1) DO VENENO DE
ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia* SOBRE FIBRAS ELÁSTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como
etapa obrigatória para obtenção da graduação em
Licenciatura em Ciências Biológicas pela
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa Dra. Ana Carolina Martins Wille

PONTA GROSSA

2024

1)Agradecimentos

Gostaria de dedicar os meus agradecimentos iniciais a professora Dr^a Ana Carolina Martins Wille, que me possibilitou trabalhar no laboratório de técnicas histológicas com uma pesquisa em cima da área que eu possuo mais interesse, agradeço também a paciência comigo e a dedicação e orientação durante as fases do desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria também de agradecer minha mãe, Sibele Müller Rocha Ferro e meu pai, Gabriel Ferro, que graças a eles eu tive condições de chegar até aqui e por nunca terem me desmotivado ou ter me obrigado a não seguir o que eu realmente queria para a minha vida. Um agradecimento especial a minha mãe por nunca me deixar esquecer dos meus objetivos e por me cobrar sempre dos meus afazeres. E ao meu pai, um agradecimento especial por ter me ensinado a pensar por conta própria e por ter me ensinado a ser o homem que eu sou.

Estendo meus agradecimentos à banca examinadora, professora Dr^a Marcia Paes e professora Dr^a Cristina Lúcia Sant'Ana Costa Ayub, por suas colocações e sugestões para que esse trabalho fosse bem realizado.

Agradeço também aos meus amigos e ao meu irmão, que sempre me arrancaram risadas, me escutaram e agradeço também pelas jogatinas noturnas, que sempre me deixavam mais alegre e aliviado.

Por último, mas nem um pouco menos importante, eu agradeço a minha namorada Camila Vitória Bizarri Grube, que me motivou, alegrou, me deu suporte emocional, aumentou minha autoestima e me fez sentir capaz de realizar esta pesquisa.

2) Resumo

As aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas como aranhas marrons, são animais cosmopolitas que causam o quadro clínico oriundo da picada de aranha mais grave do país, o loxoscelismo. Essa picada ocorre devido a compressão do animal contra o corpo, se desenvolvendo em duas possíveis formas, o loxoscelismo cutâneo, onde os sintomas ocorrem no local da picada, e o loxoscelismo sistêmico, que é quando a ação do veneno se infiltra para os órgãos internos. O veneno das aranhas marrons é composto por várias enzimas de ações peptídicas como as proteases, se destacando também as fosfolipases-D e as hialuronidases. As fibras conjuntivas se dividem em colágenas, reticulares e elásticas, possuindo a função de dar sustentabilidade e elasticidade à pele. O objetivo principal deste trabalho foi o estudo dos efeitos da fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1) da aranha *Loxosceles intermedia* sobre fibras elásticas, para isso, foram utilizadas amostras de pele de coelho tratadas com esta toxina por

vinde e quatro horas. As amostras foram emblocadas em parafina e coradas pela técnica de coloração Fucsina Resorcina. Foram observados edema, desorganização das fibras elásticas e resposta inflamatória. Sugere-se que a desorganização do tecido e especialmente das fibras elásticas possa estar relacionada com estes efeitos e não diretamente pela atividade catalítica da fosfolipase-D.

3) Introdução

3.1) Biologia das aranhas

As aranhas são artrópodes pertencentes à classe Arachnida e a ordem Araneae, desempenham papéis ecológicos muito importantes nos ambientes em que vivem, contudo podem acabar causando acidentes graves, sendo um problema de saúde pública chamado araneísmo (Barbosa, Da Silva Nunes e Amador, 2017; Benedet *et al.*, 2021). Nos dias de hoje, possuem 52314 espécies presentes dentro de 4396 gêneros e 134 famílias (World Spider Catalog 2024, versão 25.5). São animais exclusivamente predadoras, tendo como presas principalmente outros artrópodes, porém, existem registros de predação de pequenos vertebrados (Cotes *et al.*, 2018; Nyffeler e Altig, 2020).

A morfologia das aranhas é separada em duas partes, o prosoma e o opistossoma. O prosoma é a região a qual é responsável por realizar funções como a predação e locomoção, sendo nesta divisão que está localizado o cérebro, as pernas, os pedipalpos e a quelíceras ligadas a glândulas de veneno. Já o opistossoma é a parte onde se tem o sistema respiratório, excretor, digestivo e reprodutor das aranhas (Mariano-Martins, Lo-Man-Hung e Torres, 2020; Lüddecke *et al.*, 2021).

Segundo Brazil *et al* (2009), a Organização Mundial da Saúde considera apenas quatro gêneros de importância médica, sendo eles : *Latrodectus* Walckenaer 1805; *Atrax* Cambridge 1877; *Phoneutria* Perty 1833; e *Loxosceles* Heineken & Löwe 1835. No Brasil, temos a incidência dos gêneros *Latrodectus*, *Phoneutria* e *Loxosceles*, sendo respectivamente reconhecidos pelos seus nomes populares Viúva-negra, Armadeira e Aranha Marrom (Santana *et al.*, 2020).

3.2) Gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas como aranhas marrom, sendo animais cosmopolitas, pequenas, com 1 centímetro de comprimento e três centímetros de diâmetro, não

são agressivas, sendo a causa de seus acidentes a compressão da aranha contra o corpo (Aguiar *et al*, 2021; Da Justa *et al*, 2023).

Esse gênero pertence a família Sicariidae Keyserling, 1880, contendo 149 espécies, sendo 21 delas presentes no Brasil (World Spider Catalog 2024, versão 25.5). Segundo o site World Spider Catalog, as espécies de aranha que tem incidência no Brasil são:

Aranhas Loxosceles do Brasil
<i>Loxosceles adelaida</i> Gertsch, 1967
<i>Loxosceles amazonica</i> Gertsch, 1967
<i>Loxosceles anomala</i> (Mello-Leitão, 1917)
<i>Loxosceles bodoquena</i> Bertani & Gallão, 2024
<i>Loxosceles boqueirao</i> Bertani & Gallão, 2024
<i>Loxosceles cardosoi</i> Bertani, von Schimonsky & Gallão, 2018
<i>Loxosceles carinhanha</i> Bertani, von Schimonsky & Gallão, 2018
<i>Loxosceles chapadensis</i> Bertani, Fukushima & Nagahama, 2010
<i>Loxosceles ericsoni</i> Bertani, von Schimonsky & Gallão, 2018
<i>Loxosceles gaucho</i> Gertsch, 1967
<i>Loxosceles hirsuta</i> Mello-Leitão, 1931
<i>Loxosceles immodesta</i> (Mello-Leitão, 1917)
<i>Loxosceles intermedia</i> Mello-Leitão, 1934
<i>Loxosceles karstica</i> Bertani, von Schimonsky & Gallão, 2018
<i>Loxosceles laeta</i> (Nicolet, 1849)
<i>Loxosceles muriciensis</i> Fukushima, de Andrade & Bertani, 2017
<i>Loxosceles planetaria</i> Bertani & Gallão, 2024
<i>Loxosceles puortoi</i> Martins, Knysak & Bertani, 2002
<i>Loxosceles similis</i> Moenkhaus, 1898

<i>Loxosceles troglobia</i> Souza & Ferreira, 2018
<i>Loxosceles willianilsoni</i> Fukushima, de Andrade & Bertani, 2017

Tabela 1. Aranhas do gênero *Loxosceles* presentes no Brasil, tabela realizada com dados obtidos do site World Spider Catalog (25.5).0

Esses animais vivem em ambientes secos e escuros, tendo se adaptado muito bem ao meio urbano por conta do mesmo simular o cenário em que essas aranhas vivem na natureza (Fisher e Amaral, 2023). No seu ambiente natural, esses artrópodes residem em fendas, aberturas em rochas, restos de plantas, cascas de árvores, serapilheira, torrões de terra e grutas, o que é bem artificializado por ação antrópica, como telhas, tijolos, caixas de papelão, tábuas de madeira, quadros, fendas formadas pela madeira ou rodapé e roupas (Ferrari *et al*, 2023; Fisher, 2022;)

3.3) Loxoscelismo

O loxoscelismo é a forma mais grave de araneísmo do Brasil, a maior incidência destes acidentes pertencem à região Sul e Sudeste do país, tendo a maioria dos casos com ocorrência no Paraná (Silveira e De Souza, 2017; Benedet *et al*, 2021;). O acidente acontece nas regiões cobertas do corpo, como tronco, coxas, braços e pernas, por conta da aranha se esconder nas roupas ou roupas de cama e ao ser pressionada, acaba realizando a picada(Da Silva Rocha *et al*, 2021; Faria *et al* 2021). As espécies de aranha marrom que mais causam acidentes na América Latina são as *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e a *Loxosceles laeta*, tendo o soro anti loxoscélico (SALox) feito a partir do veneno dessas três espécies (Petri *et al*, 2021; Ferrari *et al*, 2023).

Essa forma de araneísmo se destaca das demais por conta de ser a única a apresentar a dermonecrose (De Carvalho *et al*, 2005). A picada da aranha pode ocasionar duas formas diferentes, o loxoscelismo cutâneo e o loxoscelismo sistêmico, também conhecido como cutâneo-visceral (Haas *et al*, 2013; Baía, Andena e Coutinho, 2023;). A forma cutânea é a mais comum, se tratando dos sintomas desenvolvidos no local da picada, sendo eles edema e eritema, que acabam, por sua vez, progredindo para uma lesão dermonecrótica (Aguiar *et al*, 2021; Da Silva Rocha *et al*, 2021;). A forma sistêmica ocorre quando o veneno se infiltra para os órgãos internos, causando danos principalmente em crianças, gestantes e/ou pessoas com baixa

imunidade, com uma série de sintomas, como febre, hemólise intravascular, insuficiência renal, anemia hemolítica e trombocitopenia (Rosen *et al*, 2012; Gremski *et al*, 2022; De Assis Santos *et al*, 2023).

3.4) Veneno loxoscélico

Seu veneno se trata de um líquido de aspecto cristalino de baixa massa molecular, sendo constituído por várias toxinas com atividade enzimática, entre elas destacam-se: as fosfolipases-D, serino-proteases, metaloproteases, hialuronidases, TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein), e peptídeos inseticidas (Chaim *et al*, 2011(A); Souza e Machado, 2017; Gremski *et al*, 2021).

As fosfolipases-D, são as proteínas mais estudadas e caracterizadas do veneno loxoscélico, sendo as responsáveis pela maioria das complicações causadas pelo acidente com essas aranhas, como hemólise, agregação plaquetária e a dermonecrose, sendo, em resultante disso, também conhecidas como toxinas dermonecróticas (Fingermann *et al*, 2020; Gremski *et al*, 2020) . O alvo das fosfolipases-D são as membranas celulares, tendo como principal atividade degradar a esfingomielina, gerando colina e ceramida-1-fosfato, o que inicialmente a deu o nome de esfingomielinases-D. Contudo, atualmente, temos a ciência de que essa toxina se expande para a bicamada fosfolipídica celular toda, clivando um amplo espectro de lipídios, como lisofosfatidilcolina, glicerofosfolipídios, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina, fator de agregação plaquetária e ácido fosfatídico cíclico, sendo conhecidas atualmente como Fosfolipases-D (Vuitika *et al*, 2016; Da Silva *et al*, 2021; Antunes, *et al*, 2022; De Freitas Netto *et al*, 2022; Chaves-Moreira *et al*, 2023).

As hialuronidases são uma família de toxinas presentes em diversos venenos do reino animal, fazendo parte da composição do veneno de serpentes, escorpiões, vespas e abelhas. Estas toxinas atuam como um fator de espalhamento gravitacional, podendo assim potencializar a ação de outros componentes do veneno. Isso ocorre por meio da lise do ácido hialurônico, o principal constituinte da matriz extracelular de vertebrados, condroitin sulfato e dermatan sulfato, fazendo com que a matriz extracelular se desmanche, facilitando a difusão do veneno (Ferrer *et al*, 2013; De-Bona *et al*, 2021; Gremski *et al*, 2021).

As proteases são uma família de toxinas que se dividem em dois tipos, as serinoproteases e as metaloproteases. As serinoproteases possuem atividade gelatinolítica,

podendo servir de amplificador para outras toxinas devido a sua ação na matriz extracelular (Chaim *et al*, 2011; Oliveira-Mendes *et al*, 2020; Gremski *et al*, 2021). No grupo das metaloproteases, temos as Loxolisinas A, as Loxolisinas B e as metaloproteases da família das astacinas. As Loxolisinas A possuem massa molecular de 20-28 KDa, tendo atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica., já as Loxolisinas B possuem 32-35 KDa e possuem atividade gelatinolítica (Gremski *et al*, 2021; De Freitas Netto *et al*, 2022; Medina-Santos *et al*, 2022). As metaloproteases da família das astacinas são conhecidas com LALP (Loxosceles Astacin-like Protease) são enzimas dependentes de zinco, com propriedades gelatinolíticas, fibronectinolíticas e fibrinogenolíticas (Chaim *et al*, 2011(A); Gremski *et al*, 2021).

Como já vimos anteriormente, as toxinas destas aranhas têm capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, contudo, a atuação nas fibras conjuntivas ainda não é um tópico muito abordado.

3.5) Fibras conjuntivas

As fibras conjuntivas são estruturas oriundas do principal constituinte da matriz extracelular, os fibroblastos, tendo como função dar sustentabilidade e elasticidade para o tecido conjuntivo do órgão à qual estão inseridos, sendo separadas em fibras colágenas e fibras elásticas (Ambrósio *et al*, 2014; Wlaschek *et al*, 2021; Da Silva *et al*, 2024).

As fibras colágenas são aquelas responsáveis por oferecer resistência e sustentabilidade, formando um arcabouço estrutural para a matriz extracelular. As fibras colágenas são formadas pela proteína denominada colágeno, sendo esta a proteína com maior fartura no corpo, compondo 90% da matriz extracelular, 75 % do peso seco da pele e 30 % de todas as proteínas humanas (Schroeder *et al*, 2020; Huang *et al*, 2021). A maior importância do colágeno está no tecido da pele, onde ele atua servindo para a manutenção e regeneração da mesma, oferecendo resistência a forças tensoras (Oliveira, Da Silva e Pinto, 2021; Pfisterer *et al*, 2021).

As fibras elásticas são as responsáveis pela elasticidade dos tecidos as quais estão inseridas, por conta disso, são mais predominantes em órgãos que necessitam de elasticidade para funcionarem eficientemente, como os pulmões, vasos sanguíneos, bexiga, ligamentos, tendões e o foco deste trabalho, a pele. As fibras elásticas são formadas principalmente por elastina (aproximadamente 90% da composição dessa fibra), altamente hidrofóbica, a qual

compõe seu núcleo, e por microfibrilas abundante em fibrinas (Theocharis *et al*, 2016; Heinz, 2021; Schmelzer e Duca, 2022; Halsey *et al*, 2023).

3.6) Justificativa

A funcionalidade das toxinas loxoscélicas nos mais variados tecidos ainda é um ambiente um tanto inóspito, o que acaba por gerar várias lacunas no conhecimento em cima deste tão vasto assunto. O presente trabalho visa ser uma forma expandir o conhecimento sobre os efeitos das toxinas destes aracnídeos nas fibras conjuntivas, com um maior enfoque nas fibras elásticas.

4) Objetivos

4.1) Objetivos gerais

- Avaliar por diferentes técnicas de coloração os efeitos da fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* na pele de coelhos.

4.2) Objetivos específicos

- Observar os efeitos das fosfolipases-D loxoscélicas na organização das fibras elásticas na pele de coelhos;
- Comparar os dados obtidos com outros de pesquisas anteriores realizados pelo grupo ou descritos na literatura;
- Estudar comparativamente e buscando verificar se existem relações entre os danos observados nas diferentes fibras conjuntivas na epiderme de coelhos;

5) Material e métodos

Para esta pesquisa, foi feito o uso de amostras de pele de coelho já emblocadas em parafina, tratadas por 24 horas com fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT1), obtidas anteriormente por projeto de pesquisa interinstitucional, realizados em parceria com Universidade Federal do Paraná (UFPR). As amostras foram reaproveitadas pelo grupo da UEPG e coradas por diferentes métodos de coloração histológica com a finalidade de

observar a localização e a integridade das fibras conjuntivas, das células, além da organização tecidual.

O projeto interinstitucional foi aprovado pelo comitê de ética e de biossegurança emitido pela UFPR. Na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Bloco M, no Laboratório de Técnicas Histológicas (M60), os tecidos emblocados em parafina foram cortados em micrótomo na espessura de 15 μ m e posteriormente corados. A parafina foi inicialmente removida dos cortes com banhos de xilol e para este trabalho os cortes foram corados de acordo com a técnica de Fucsina Resorcina onde foi possível observar as fibras elásticas pela sua especificidade em corar os componentes do sistema elástico;

Os resultados obtidos de três amostras de cada variável foram analisados por escores de 0 a 3 quanto a organização das fibras elásticas (0 = tecido conjuntivo preservado, sem danos observáveis pela técnica; 1 = tecido conjuntivo com poucas alterações; 2 = fibras desorganizadas; 3 = fibras conjuntivas bastante alteradas). Para análise estatística dos dados obtidos de forma semi-quantitativa foi utilizado o modelo não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ou seja, quando $p < 0,05$ as diferenças foram consideradas significativas.

6) Resultados

Os resultados obtidos das amostras de pele de coelho tratadas com a toxina loxoscélica recombinante LiRecDT1 na concentração de 10 μ g/mL por 24 horas e coradas pela técnica de fucsina resorcina mostraram uma desordem nas fibras elásticas da pele do animal exposto, além disso, também foi observado uma intensa infiltração leucocitária muito marcante no animal submetido ao tratamento com esta toxina (Figura 1D).

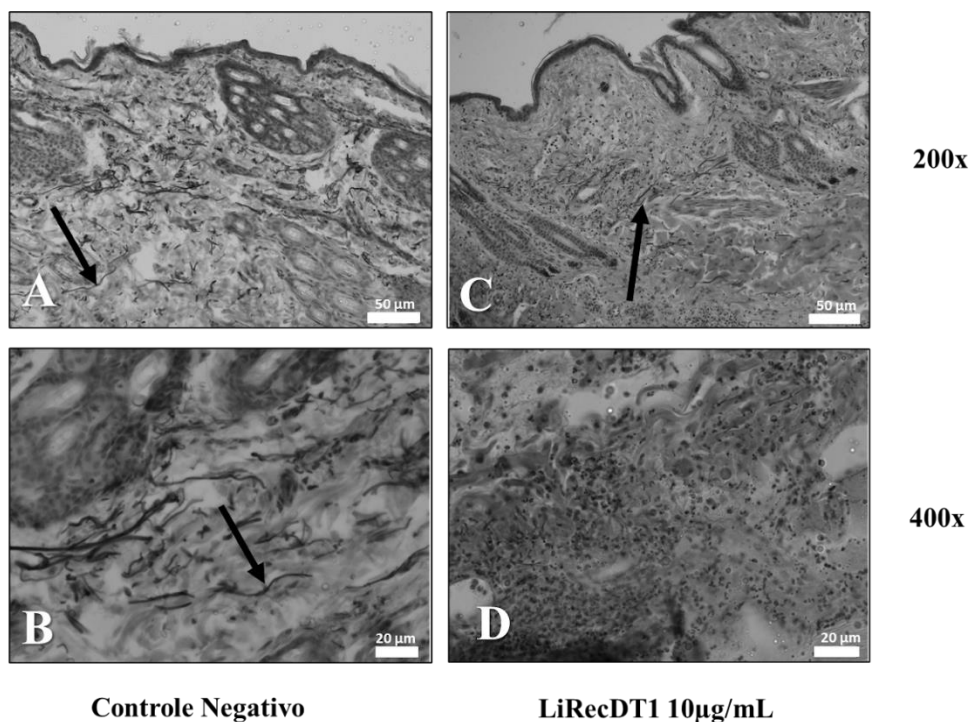


Figura 1. Pele de coelhos tratadas com a fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* (LiRecDT1) e coradas pela técnica de Fucsina Resorcina. Imagens **A e B** mostram o controle negativo (PBS). As imagens **C e D** mostram a pele submetida às toxinas loxoscélicas (LiRecDT1), nas concentrações de 10µg/mL por 24 horas. **A e C** no aumento de 200x, **B e D** aumento de 400x.. A seta apontada nas imagens **A, B e C** evidenciam as fibras elásticas, algo que é impossível de ver na imagem **D**, porém é possível visualizar nesta imagem a resposta inflamatória do animal, por meio da presença das células de defesa.

Estudos anteriores realizados pelo grupo mostraram que pela coloração de Tricrômico de Mallory, foi possível perceber uma degradação das fibras colágenas, além de uma visível deterioração do tecido conjuntivo, com várias falhas na sua composição e espaços indicativos de edema, além disso, presença intensa de hemácias indicando hemorragia local além de outras células relacionadas a processos inflamatórios (Figura 2).

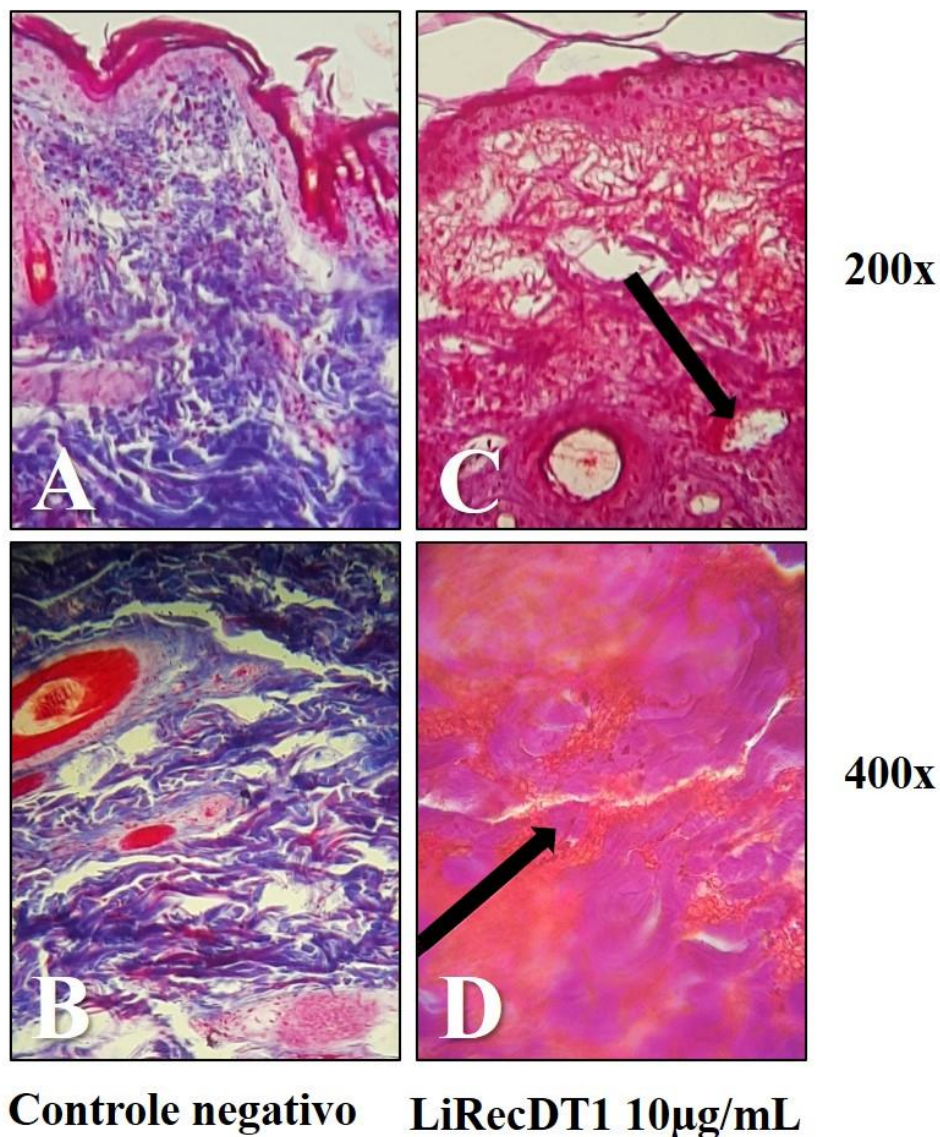


Figura 2. Pele de coelhos tratadas com a fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* (LiRecDT1) e coradas pela técnica de Tricrômico de . **Imagens A e B** mostrando o controle negativo (PBS), **C e D** amostras submetidas à concentrações de 10µg/mL da toxina loxoscélica LiRecDT1 por 24 horas. Na **imagem C**, a seta indica a deterioração de um vaso sanguíneo, na **figura D** a seta mostra a degradação das fibras colágenas. **Imagens A e C** aumento de 200x, **imagens B e D** aumento de 400x (Imagens não publicadas, obtidas por Mariana Mataruna).

A análise das amostras mostrou resultados altamente significativos quanto a desorganização das fibras elásticas causadas por LiRecDT1 após 24 horas de tratamento (Figura

3). Essa desorganização ocorreu mais frequentemente na derme reticular nas áreas onde foram observadas a resposta inflamatória e edema.

Efeito da fosfolipase D recombinante (LiRecDT1) de aranha marrom sobre a organização das fibras elásticas na derme de coelhos

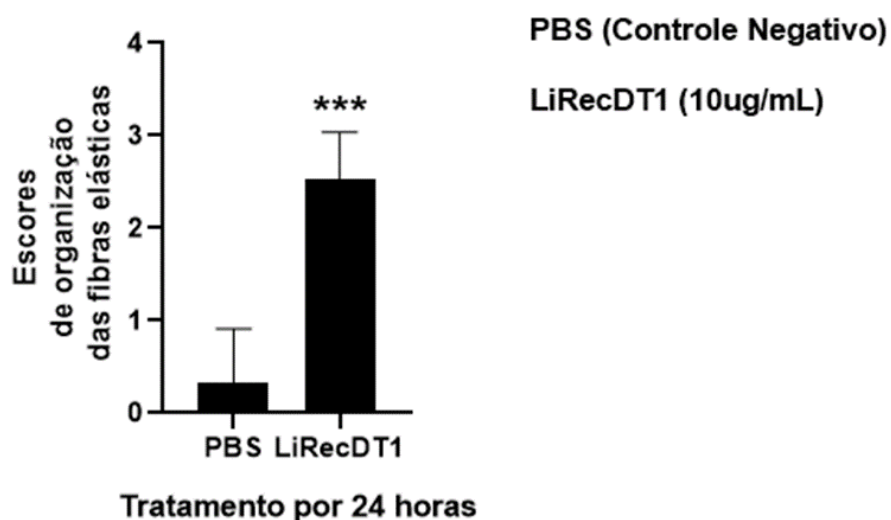


Figura 3. Análise semi-quantitativa do efeito da fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* (LiRecDT1) sobre as fibras elásticas. Os dados mostraram a desorganização das fibras elásticas como consequência do tratamento com LiRecDT1 por 24 horas. A significância foi definida como $p < 0,05$.

7) Discussão

A pele é composta por três camadas, sendo da mais superficial para a mais profunda, epiderme, derme e hipoderme. A derme é a região onde abriga as fibras conjuntivas, sendo dividida em derme papilar, região mais externa da pele contendo fibras colágenas frouxas e fibras elásticas finas, e derme reticular, contendo fibras de colágeno mais firmes e fibras elásticas mais grossas (Kanitakis, 2002; Khavkin e Ellis, 2011). A análise do trabalho foi feita na região da derme reticular de coelhos, sendo observado que a fosfolipase D recombinante de *L. intermedia* (LiRecDT1) foi capaz de desorganizar o sistema elástico, o mesmo foi observado

por GREMSKI *et al* (2020) com as fibras colágenas, sendo este novo achado mais uma das várias propriedades lesivas que essa substância possui na pele.

O estudo dos efeitos em fibras colágenas é bastante presente na literatura, Chaim *et al* (2011) Vuitika *et al* (2013), Chaves-Moreira *et al* (2017), da Silva *et al* (2021), Antunes *et al* (2022), Rodrigues *et al* (2024) são alguns dos artigos que acabaram por analisar a desorganização das fibras de colágeno na pele de coelhos. Os métodos utilizados nos trabalhos citados assemelham-se a este, no entanto, a técnica de coloração utilizada para confecção das lâminas foi de Hematoxilina e Eosina (HE), não sendo observado o desarranjo das fibras elásticas na pele. Todavia, o material de Mataruna e colaboradores (2021), analisou os efeitos das fosfolipases-D no arranjo das fibras colágenas utilizando a técnica histológica de Tricrômico de Mallory (figura 2), sendo esta técnica mais funcional para a visualização de fibras colágenas e musculares. Este trabalho difere completamente dos supracitados no que diz respeito a observação de possíveis alterações no sistema elástico e ao emprego da técnica histológica, sendo utilizado fucsina resorcina, a qual é indicada para visibilidade das fibras elásticas. Além da desorganização evidente das fibras colágenas foi observada resposta inflamatória na região onde a fosfolipase-D LiRecDT1 foi injetada. Tal resposta inflamatória também foi observada em pele de coelhos tratados com LiRecDT1 H12A, uma fosfolipase-D mutada cuja alteração na sequência de aminoácidos do sítio catalítico inativa a atividade enzimática de LiRecDT1, no entanto, não causa dermonecrose Chaim *et al* (B) (2011). Mesmo não possuindo atividade catalítica, a enzima foi capaz de desencadear resposta inflamatória e desorganizar o tecido (dados não mostrados). Desta forma, pode-se sugerir que a fosfolipase-D é capaz de alterar a estrutura do tecido conjuntivo possivelmente como resultado da resposta inflamatória causada tanto por LiRecDT1 quanto por LiRecDT1 H12A. Portanto, os danos observados nas fibras elásticas, provavelmente não dependem diretamente da atividade catalítica da enzima sobre as fibras elásticas, mas indiretamente como consequência da resposta inflamatória e do edema causado por esta toxina.

O trabalho apresentou diversas limitações, o simples fato de ser pioneiro na análise dos efeitos de fosfolipase-D loxoscélicas sobre o sistema elástico trouxe complicações por conta da inexistência de artigos para análise e comparação de resultados e discussões. Além disso, a padronização da técnica e metodologia empregados. No que diz respeito ao material, as amostras são difíceis de conseguir, especialmente por serem realizados experimentos com coelhos e falta de espaço para a manutenção e experimentos com este tipo de animal na UEPG,

além disso, todas as toxinas serem produzidas pela UFPR o que dificulta a repetição e aumento do número de amostras para a realização mais ampla dos resultados.

Quanto à metodologia, a espessura grossa dos cortes (necessário para conseguir visualizar as fibras elásticas) os fazia se soltarem muito facilmente da lâmina durante as fases de desparafinização, lavagem e desidratação e coloração. Este empecilho foi onipresente em toda a obtenção de resultados, tornando a coloração um trabalho árduo, onde não se tinha certeza se o material chegaria até a fase final e cobertura com lamínula.

A visualização do sistema elástico na pele tratada por fosfolipases-D de aranhas marrons nunca havia sido feita, sendo esta pesquisa algo inédito na literatura. A importância desta pesquisa está relacionada com o conhecimento do dano causado, podendo possibilitar para a medicina novos conhecimentos que futuramente poderão direcionar um tratamento novo para esta lesão e buscar melhorias no processo de cicatrização. Algumas sugestões para possíveis pesquisas futuras seria deixar a fosfolipase-D atuando por mais tempo como, por exemplo: 48, 72 horas ou 5, 10, 15, 20 e 30 dias, a fim de analisar se a atuação da LiRecDT1 em fibras elásticas se expande para as regiões mais próximas da epiderme ou se tem atuação no processo de reparação e cicatrização da ferida dermonecrótica.

8) Conclusão

O estudo dos efeitos das toxinas do veneno de aranha marrom sobre as fibras conjuntivas ainda possui grandes lacunas no conhecimento, especialmente quando observamos as fibras reticulares e elásticas. As fosfolipases-D são capazes de desorganizar tanto as fibras colágenas quanto as fibras elásticas, porém, essa desorganização pode não ter sido relacionada com a atividade dermonecrótica em si, mas sim com a resposta inflamatória, edema e eritema que a picada causa. Para uma melhor compreensão seria interessante aumentar o tempo de tratamento dessas toxinas na pele, visando observar a evolução dos danos em todas as regiões da pele e não apenas na região onde ocorreu a resposta inflamatória além do processo de reparação.

9) Referências

- ABREU-SILVA, Ana L. et al. Estudo histológico e histoquímico da pele de jurará *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Testudines: Kinosternidae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 911-916, 2014;
- ANTUNES, Bruno Cesar et al. Production and functional evaluation of anti-*Loxosceles* sera raised by immunizations of rabbits with mutated recombinant phospholipases-D. **Biomedicines**, v. 11, n. 1, p. 79, 2022;
- AGUIAR, Vanessa Gomes et al. Caracterização de acidentes provocados por Aranha Marrom (*Loxosceles* sp). **Revista de Casos e Consultoria**, v. 12, n. 1, p. e22513-e22513, 2021;
- BAÍÁ, Lucile da Silva Lins; ANDENA, Sergio; COUTINHO, Tania Alen. Tratamento integrativo com ozonioterapia e fotobiomodulação em ferida causada por loxoscelismo cutâneo em cão: Relato de caso. **Pubvet**, v. 17, n. 03, p. e1360-e1360, 2023;
- BARBOSA, Isabelle Ribeiro; DA SILVA NUNES, Aryelly Dayane; AMADOR, Ana Edimilda. ARANEÍSMO NO MUNICÍPIO DE NATAL, RIO GRANDE DO NORTE NO PERÍODO DE 2007 A 2014. **Revista Ciência Plural**, v. 3, n. 1, p. 22-34, 2017;
- BENEDET, Daiana Patrícia et al. Epidemiologia do araneísmo por *Loxosceles* e phoneutria no município de Cruzeiro do Iguaçu, Paraná–Brasil. **Rev Cienc Med Biol**, v. 20, n. 1, p. 22-7, 2021;
- BRAZIL, Tania K. et al. Aranhas de importância médica do Estado da Bahia, Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009;
- CHAIM, Olga M. et al. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 2, p. 84-96, 2011 (A);
- CHAIM, O. M. et al. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, v. 3, n. 3, p. 309–344, 22 mar. 2011 (B);
- CHAVES-MOREIRA, Daniele et al. Brown spider venom phospholipase-D activity upon different lipid substrates. **Toxins**, v. 15, n. 2, p. 109, 2023;
- CHAVES-MOREIRA, Daniele et al. Potential implications for designing drugs against the brown spider venom phospholipase-D. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 4, p. 726-738, 2017;
- COTES, Belén et al. Spider communities and biological control in native habitats surrounding greenhouses. **Insects**, v. 9, n. 1, p. 33, 2018.

- DA SILVA, Natan Cordeiro et al. Morfofisiologia da pele e o processo de envelhecimento cutâneo. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 24, n. 4, p. e16051-e16051, 2024;
- DA SILVA, P. H. *et al.* Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, dez. 2004;
- DA SILVA, Thaís Pereira et al. Brown spiders' phospholipases-D with potential therapeutic applications: functional assessment of mutant isoforms. **Biomedicines**, v. 9, n. 3, p. 320, 2021;
- DA SILVA ROCHA, Kaio Danilo Leite et al. Severe evolution of brown spider arachnid accident: A case report. **Amadeus International Multidisciplinary Journal**, v. 6, n. 11, p. 26-33, 2021;
- DA JUSTA, Hanna Câmara et al. Comparative Biochemical, Structural, and Functional Analysis of Recombinant Phospholipases D from Three Loxosceles Spider Venoms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12006, 2023;
- DE ASSIS SANTOS, Sílvia Vitória et al. LESÃO DERMONECRÓTICA EM REGIÃO DORSAL EM UM CÃO: LESÕES COMPATÍVEIS COM LOXOSCELISMO: DERMONECROTIC LESION ON THE DORSAL REGION IN A DOG: LESIONS COMPATIBLE WITH LOXOSCELISM. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 21, n. 2, p. 221-225, 2023;
- DE-BONA, Elidiana et al. Produção de uma nova hialuronidase recombinante de aranha marrom em células de inseto infectadas por baculovírus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 146, p. 109759, 2021;
- DE FREITAS NETTO, Felício et al. Atividade nefrotóxica da peçonha de loxosceles spp Nephrotoxic activity of loxosceles spp venom. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 33067-33079, 2022;
- FARIA, Bianca Casarotto Lima et al. Acidente por picada de Aranha Marrom- Loxosceles: um relato de caso no Distrito Federal. **Health Residencies Journal-HRJ**, v. 2, n. 10, p. 8-16, 2021;
- FERRARI, Caio Augusto Vendrami et al. PRESENÇA DE Loxosceles laeta (ARANHA MARROM) NA ÁREA RURAL DE IBIRAMA, SC, BRASIL. **Anais da Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI)-e-ISSN 2316-7165**, v. 1, n. 16, 2023;

- FERRER, Valeria Pereira et al. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2206, 2013;
- FINGERMANN, Matías et al. Biotechnological potential of Phospholipase D for *Loxosceles* antivenom development. **Toxicon**: X, v. 6, p. 100036, 2020;
- FISCHER, Marta Luciane. Vivências de 30 anos do loxoscelismo em Curitiba, Paraná, Brasil: rumos de uma educação em saúde disruptiva, inclusiva, humanitária e sustentável. **Revista Inclusiones**, v. 9, n. 3, p. 52-77, 2022;
- FISCHER, Marta Luciane; DE OLIVEIRA AMARAL, Vanessa. Estratégia reprodutiva da aranha-marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934)(Araneae; Sicariidae):: funcionalidade de estruturas secundárias das espermatecas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 22, n. 2, p. 220-227, 2023;
- GREMSKI, Luiza Helena et al. Forty years of the description of brown spider venom phospholipases-D. **Toxins**, v. 12, n. 3, p. 164, 2020;
- GREMSKI, L. H. *et al.* 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, 2021;
- GREMSKI, Luiza Helena et al. Systemic loxoscelism, less frequent but more deadly: the involvement of phospholipases D in the pathophysiology of envenomation. **Toxins**, v. 15, n. 1, p. 17, 2022;
- HAAS, Jucelaine et al. Acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* spp. em Laranjeiras do Sul-PR. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 1, p. 15-22, 2013;
- HALSEY, Gregory et al. Role of elastic fiber degradation in disease pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1869, n. 5, p. 166706, 2023;
- HEINZ, Andrea. Elastic fibers during aging and disease. **Ageing research reviews**, v. 66, p. 101255, 2021;
- HUANG, Jiacheng et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 153, 2021;
- KANITAKIS, Jean. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-401, 2002;

- KHAVKIN, Jeannie; ELLIS, David AF. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics**, v. 19, n. 2, p. 229-234, 2011;
- LÜDDECKE, Tim et al. The biology and evolution of spider venoms. **Biological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 163-178, 2022.
- MARIANO-MARTINS, Pedro; LO-MAN-HUNG, Nancy; TORRES, Tatiana Teixeira. Evolution of spiders and silk spinning: Mini review of the morphology, evolution, and development of spiders' spinnerets. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 109, 2020.
- MATARUNA, M, L. C. et al. EFEITO DE FOSFOLIPASES-D LOXOSCÉLICAS NA DERME DE COELHOS OBSERVADOS PELA TÉCNICA HISTOLÓGICA DE COLORAÇÃO TRICÔMIO DE MALLORY. **XXX Encontro Anual de Iniciação Científica, VII Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior**, 2021;
- MEDINA-SANTOS, Raíssa et al. Análise de dados de NGS da glândula de veneno da aranha peruana *Loxosceles laeta* revela diversidade de toxinas. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 43, p. 101017, 2022;
- **NMBE - World Spider Catalog**. Disponível em: <<https://wsc.nmbe.ch/statistics/>>;
- NYFFELER, Martin; ALTIG, Ronald. Spiders as frog-eaters: a global perspective. **The Journal of Arachnology**, v. 48, n. 1, p. 26-42, 2020;
- OLIVEIRA-MENDES, B. B. R. DE *et al.* From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: An overview focused on *Loxosceles similis*. **Toxicon**, v. 173, p. 5–19, jan. 2020;
- OLIVEIRA, Nayara Rosa; DA SILVA, Ivanilde Almeida; PINTO, Rafaela Rocha. Colágeno: uma breve revisão Collagen: a brief review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 103346-103355, 2021;
- PETRI, Guilherme Enrico et al. Principais medidas de tratamento para acidentes envolvendo aranhas das espécies *latrodectus*, *loxosceles* e *phoneutria*—uma revisão de literatura. **Revista Educação em Saúde**, v. 9, n. 1, p. 169-180, 2021;
- PFISTERER, Karin et al. The extracellular matrix in skin inflammation and infection. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 682414, 2021;
- POLLI, Nayanne Louise Costacurta et al. Novel insights into the application of recombinant mutated phospholipases D as antigens for developing new strategies against Loxoscelism. **Acta Tropica**, v. 258, p. 107354, 2024;

- RODRIGUES, Gabriela Marques et al. Protective effects of mesenchymal stromal cell-derived secretome on dermonecrosis induced in rabbits by *Loxosceles intermedia* spider venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 30, p. e20240004, 2024;
- ROSEN, Jessica L. et al. Emergency department death from systemic loxoscelism. **Annals of emergency medicine**, v. 60, n. 4, p. 439-441, 2012;
- SANTANA, Luiz Alberto et al. Arachnidism in Brazil/Araneísmo no Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 12859-12872, 2020;
- SCHMELZER, Christian EH; DUCA, Laurent. Elastic fibers: Formation, function, and fate during aging and disease. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 13, p. 3704-3730, 2022;
- SCHROEDER, Alexandra B. et al. Optical imaging of collagen fiber damage to assess thermally injured human skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 28, n. 6, p. 848-855, 2020;
- SILVA-MAGALHÃES, Rafaela et al. *Loxosceles amazonica* Brown Spider venom: Insights into enzymatic activities, immunorecognition, and novel phospholipase D isoforms. **Biochimie**, 2024;
- SILVEIRA, Adriano Lima; SOUZA, Maria Nelman Antunes de. Ocorrência sinantrópica da aranha-marrom *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) em áreas serranas no Estado de Minas Gerais, Brasil, e notas sobre loxoscelismo. **Rev Med Minas Gerais**, v. 2017, n. 27, 1858;
- SOUZA, C. M. V.; MACHADO, C.; Animais de importância médica no município do Rio de Janeiro. **Journal Health NPEPS**, v. 2, p. 16-39, mar. 2017;
- THEOCHARIS, Achilleas D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016;
- VUITIKA, L. et al. Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 9, p. 970-979, 2016;
- WLASCHEK, Meinhard et al. Connective tissue and fibroblast senescence in skin aging. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 4, p. 985-992, 2021;