

Atividade nefrotóxica da peçonha de *loxosceles spp*

Nephrotoxic activity of *loxosceles spp* venom

DOI:10.34117/bjdv8n5-029

Recebimento dos originais: 21/03/2022

Aceitação para publicação: 29/04/2022

Felício de Freitas Netto

Graduado em Medicina (UEPG)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: feliciofnetto@gmail.com

Fabiana Postiglione Mansani

Doutorado em Ciências Bioquímicas pela UFPR e Universidade de Coimbra

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: fpmansani@gmail.com

Eduardo Berto Rech

Acadêmico de Medicina (UEPG)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: eduardoberto.r@gmail.com

Gabriel Leme Campos

Acadêmico de Medicina – UEPG

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: gabriellemecampos@gmail.com

Gabriel Mirmann Alves de Souza

Acadêmico de Medicina (UEPG)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: gabrielmirmannas@gmail.com

Gabriela Smokanitz

Acadêmica de Medicina (UEPG)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: gabrielasmokanitz@hotmail.com

Luana Gabriele Bueno

Acadêmica de Medicina (UEPG)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: luanabueno2305@hotmail.com

Pauline Thaís Skonieski

Acadêmica de Medicina (UEPG)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, CEP: 84030-900

E-mail: paulinesko@icloud.com

RESUMO

Aranhas do gênero *Loxosceles* são animais peçonhentos cuja picada pode apresentar diversas manifestações, dentre elas a possibilidade de acometimento renal. Evidenciar a atividade nefrotóxica, direta e indireta, das diferentes substâncias contidas na peçonha da *Loxosceles spp.* O presente estudo trata-se de uma revisão literária de artigos científicos publicados nos últimos 25 anos, indexados na base de dados científicas PUBMED, SCIELO, Science Direct. Vinte e um artigos que correspondiam aos critérios de inclusão foram selecionados para integrar este estudo. Na peçonha de *Loxosceles spp.*, existem compostos que causam, direta e indiretamente, efeitos deletérios em seres humanos. Estes efeitos podem ser locais ou sistêmicos, sendo a lesão renal aguda (LRA) a forma mais grave. A peçonha referida é capaz de afetar o tecido sanguíneo, podendo levar a distúrbios hemolíticos intravasculares e à coagulação intravascular disseminada (CIVD). Um de seus componentes é a fosfolipase-D (previamente conhecida como esfingomielinase), que embora não seja a proteína com a maior expressividade na toxina da aranha *Loxosceles*, é a mais definida e estudada pela literatura e possui papel fundamental tanto na ação local, quanto sistêmica, induzindo à dermonecrose e hemólise. Nos rins, a peçonha se liga às células glomerulares, tubulares e membranas basais, podendo levar à LRA. A fosfolipase-D tem como principal ação a hidrólise da esfingomielinina, componente da membrana externa dos eritrócitos, mas pode promover o mesmo efeito em outros constituintes da membrana celular. Essa enzima provoca a lise celular renal em humanos, concomitante à ativação e secreção de metaloproteases da matriz extracelular (MEC). Ao hidrolisar fosfolipídios, postula-se que a toxina dermonecrótica ative vias de sinalização em diferentes células, causando alterações fisiopatológicas. Um estudo detectou que a toxina se liga aos glomérulos e túbulos renais de camundongos, reforçando a ideia de uma relação direta com a LRA. O processamento da hemoglobina resultante da hemólise contribui, indiretamente, para este quadro.

Palavras-chave: aranha-marrom, lesão renal aguda, peçonha, loxoscelismo.

ABSTRACT

Spiders of the genus *Loxosceles* are venomous animals whose bite may present several manifestations, among them the possibility of renal involvement. The aim of this study is to evidence the direct and indirect nephrotoxic activity of the different substances contained in the venom of *Loxosceles spp.* This study is a literature review of scientific articles published in the last 25 years, indexed in the scientific databases PUBMED, SCIELO, and Science Direct. Twenty-one articles that matched the inclusion criteria were selected to be part of this study. *Loxosceles spp.* venom contains compounds that directly and indirectly cause deleterious effects in humans. These effects can be local or systemic, with acute kidney injury (AKI) being the most severe form. The referred venom is capable of affecting blood tissue, and can lead to intravascular hemolytic disorders and disseminated intravascular coagulation (DIC). One of its components is phospholipase-D (previously known as sphingomyelinase), which although not the protein with the highest expressivity in *Loxosceles* spider toxin, is the most defined and studied in the literature and has a key role in both local and systemic action, inducing dermonecrosis and

hemolysis. In the kidneys, the venom binds to glomerular cells, tubular cells, and basement membranes, and can lead to AKI. The main action of phospholipase-D is the hydrolysis of sphingomyelin, a component of the outer membrane of erythrocytes, but it can have the same effect on other constituents of the cell membrane. This enzyme causes renal cell lysis in humans, concomitant with the activation and secretion of extracellular matrix metalloproteases (ECM). By hydrolyzing phospholipids, it is postulated that dermonecrotic toxin activates signaling pathways in different cells, causing pathophysiological changes. One study found that the toxin binds to mouse glomeruli and renal tubules, reinforcing the idea of a direct relationship with AKI. The processing of hemoglobin resulting from hemolysis contributes, indirectly, to this picture.

Keywords: brown spider, acute kidney injury, venom, loxoscelism.

1 INTRODUÇÃO

As aranhas, do gênero *Loxosceles*, são animais que podem atingir até 3 cm de comprimento, possuem hábito noturno e não são agressivas, de tal modo que acidentes loxoscélicos ocorrem quando as mesmas são comprimidas contra o corpo da vítima. No entanto, sua picada, geralmente, é imperceptível e reconhecida por apresentar duas manifestações clínicas: a manifestação cutânea, mais frequente e de menor gravidade; e a cutâneo-hemolítica ou cutâneo-visceral, menos frequente, porém de maior gravidade e letalidade, em especial, quando se tem acometimento renal.^[1] No Brasil, sete espécies de *Loxosceles* foram relatadas, a maioria nas regiões Sul e Sudeste^[2], sendo que a região Sul, segundo o Sistema de Informações de Agravos de Notificações (Sinan), notificou 40576 acidentes loxoscélicos entre 2015 e 2021^[3], o que ratifica a necessidade de conhecimento deste assunto pela comunidade médica.

Ademais, a ação da peçonha tem atividade citotóxica, logo, seu mecanismo de ação é de lise celular. Dentre os variados componentes dessa peçonha, temos duas enzimas principais: a hialuronidase e a esfingomielinase tipo D. A hialuronidase funciona como facilitadora, driblando o sistema de defesa do organismo, desligando-o, tornando a ação esfingomielinásica mais eficaz do ponto de vista citotóxico. Dois são os alvos principais dessas enzimas: a pele e o rim.^[4]

Diante do exposto, considerando-se o número crescente de estudos sobre acidentes loxoscélicos, dada a sua relevância clínico-epidemiológica, esta revisão de literatura tem como objetivo evidenciar a atividade nefrotóxica, direta e indireta, das diferentes substâncias contidas na peçonha da *Loxosceles spp.*

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de revisão literária levantado a partir de artigos científicos publicados nos últimos 25 anos (1997-2022) e indexados nas seguintes bases de dados científicas: PUBMED, SCIELO e *Science Direct*. Para este fim, foram usadas – inicialmente – as palavras-chave: “*Loxosceles*” e “*loxoscelism*”; e, após isso, utilizou-se o operador booleano “*and*” para relacioná-las a outras palavras-chave: “*acute kidney injury*”, “*hemolysis*”, “*toxins*”, “*rhabdomyolysis*” e “*renal biopsy*”. Como ferramenta auxiliar, foi utilizado o sistema DATASUS para coletar dados epidemiológicos sobre acidentes com *Loxosceles spp.* Com isso, foram achados 32 artigos correspondentes. Porém, de acordo com o objetivo deste estudo, apenas 21 artigos relacionavam loxoscelismo à lesão renal aguda, tornando este o número final de estudos utilizados para esta revisão literária.

3 RESULTADOS

Estudos demonstraram que, ao isolar uma fração da peçonha de *Loxosceles spp.*, há capacidade bioquímica de que ela se incorpore às membranas eritrocitárias – de eritrócitos humanos – tornando-as suscetíveis ao sistema complemento alternativo, além de possuir conformação isomérica de uma fosfolipase^[5]. A ativação dessa via, ou a perda de sua capacidade regulatória, desencadeia uma série de eventos que pode resultar em hemólise^[6].

3.1 ENZIMAS

As fosfolipases tipo D – anteriormente chamadas de esfingomielinases – as metaloproteases, as hialuronidases e os peptídeos de baixo peso molecular são os principais constituintes da peçonha loxoscélica^[7]. As fosfolipases tipo D não são as proteínas de maior expressividade quantitativa, contudo são as mais estudadas e relacionadas aos efeitos sistêmicos das picadas por aranha-marrom^[8].

Inicialmente, as fosfolipases tipo D eram denominadas de esfingomielinases, devido à sua ação na esfingomielina das membranas celulares. Entretanto, fora observado que sua atividade se expandia para toda a bicamada fosfolipídica celular, justificando-se sua mudança de nomenclatura para fosfolipases, tornando – dessa forma – mais abrangente sua atividade lítica^[7, 8].

Todas as espécies de *Loxosceles spp.*, a serem citadas *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. boneti*, são dotadas de peçonha constituídas pelas referidas enzimas,

destacando-se as fosfolipases do tipo D. Alguns estudos eletroforéticos, todavia, evidenciaram diferentes proporções enzimáticas a depender da espécie. Sendo assim, identificou-se que *Loxosceles intermedia* contém a peçonha com maior concentração de fosfolipases-D, correspondendo a 20,2% do total. Por outro lado, a proporção desta enzima na peçonha de *Loxosceles laeta* é de, aproximadamente, 16,4%^[5].

As fosfolipases-D possuem papel fundamental na deflagração dermonecrótica da picada da aranha-marrom, a partir da ativação quimiotática neutrofílica, ativando assim a via alternativa do sistema complemento, com consequente liberação de interleucina agregação plaquetária secundária^[9].

As metaloproteases, por sua vez, constituem um grupo enzimático de endopeptidases zinco-dependentes ligadas à membrana celular que possuem a capacidade de hidrólise proteica, incluindo proteínas da MEC, tais quais colágeno, fibronectina ou moléculas da superfície celular^[2]. Sua atividade pode gerar distúrbios hemorrágicos dérmicos, lesão vascular, adesão plaquetária imperfeita e cicatrização defeituosa^[10]. Para finalizar, as hialuronidases têm potencial lítico contra o ácido hialurônico – componente da MEC – que podem estimular a irradiação gravitacional da dermonecrose, característica peculiar da lesão cutânea loxoscélica^[11].

3.2 EFEITOS NO TECIDO SANGUÍNEO

Uma série de relatos de casos descreveu hemólise intravascular associada ao envenenamento por aranha marrom, indicando-se que há atividade hemolítica direta da peçonha contra os eritrócitos^[10].

Ao isolar uma porção da peçonha loxoscélica, apontou-se sua capacidade de incorporação às membranas eritrocitárias humanas, tornando-as suscetíveis ao sistema complemento alternativo^[5]. Por essa mesma perspectiva, outro estudo afirma que a ativação dessa via, ou a perda da capacidade de sua regulação, desencadeia eventos hemolíticos^[6].

Visto que algumas importantes substâncias da peçonha de *Loxosceles spp.* são isômeros fosfolipásicos^[12], as mesmas têm facilidade para se incorporar à membrana celular humana, fazendo com que haja reorganização da estrutura fosfolipídica da referida estrutura^[7], alterando sua conformação estrutural e, consequentemente, funcional.

Outro grupo enzimático presente na peçonha da aranha-marrom são as metaloproteases^[4], cuja capacidade lítica vascular justifica-se por sua ligação ao endotélio dos vasos sanguíneos, gerando danos à matriz extracelular (MEC) e prejudicando a

homeostasia deste ambiente, devido à deposição de fibrina, formação trombótica, distúrbios hemorrágicos e aumento da permeabilidade vascular^[13, 14].

É importante salientar que a hemólise direta induzida pela esfingomielinase D (atualmente, conhecida como Fosfolipase D), contida na peçonha da *Loxosceles spp.*, é dose, tempo e concentração dependente. Entretanto, é independente do tiposanguíneo^[7].

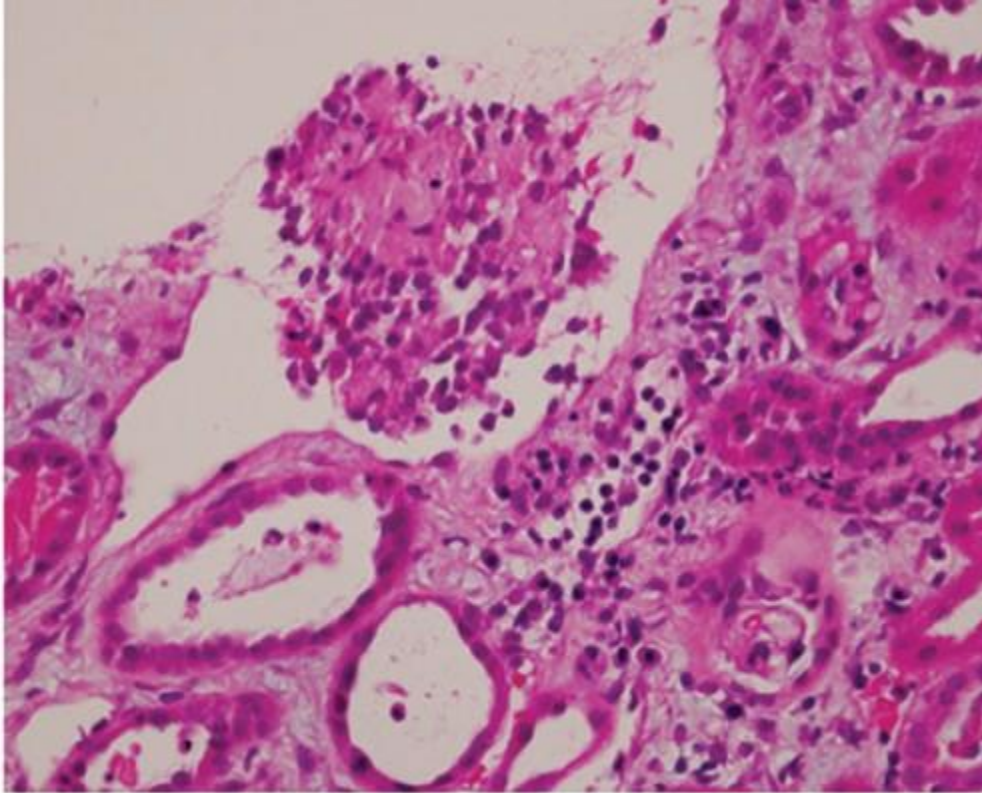
3.3 LESÃO RENAL AGUDA (LRA)

Além das alterações hematológicas causadas pela ação das toxinas da peçonha de *Loxosceles spp.* que podem resultar, indiretamente, em LRA^[7], há – também – a gênese direta da nefrotoxicidade^[9]. Estudos realizados em camundongos explicam o referido mecanismo^[2, 9, 10, 11].

A partir de métodos de imunofluorescência, evidenciou-se que as toxinas da peçonha se ligam às células glomerulares, tubulares e às membranas basais renais^[2]. Experimentos histológicos mostraram deposição de hemácias extravasculares pericapilares glomerulares no espaço de Bowman. Além disso, há deposição das toxinas ao longo das membranas basais, o que explica a lesão das células epiteliais glomerulares (Figura 1)^[10]. A dilatação tubular foi outro aspecto encontrado, com a presença de resíduos celulares^[9, 15] devido ao edema intersticial com hemácias extravasculares, degeneração vacuolar dos túbulos proximais e distais e ao acúmulo de material eosinofílico na luz dos túbulos corticais e medulares, como mostra a Figura 2 [10].

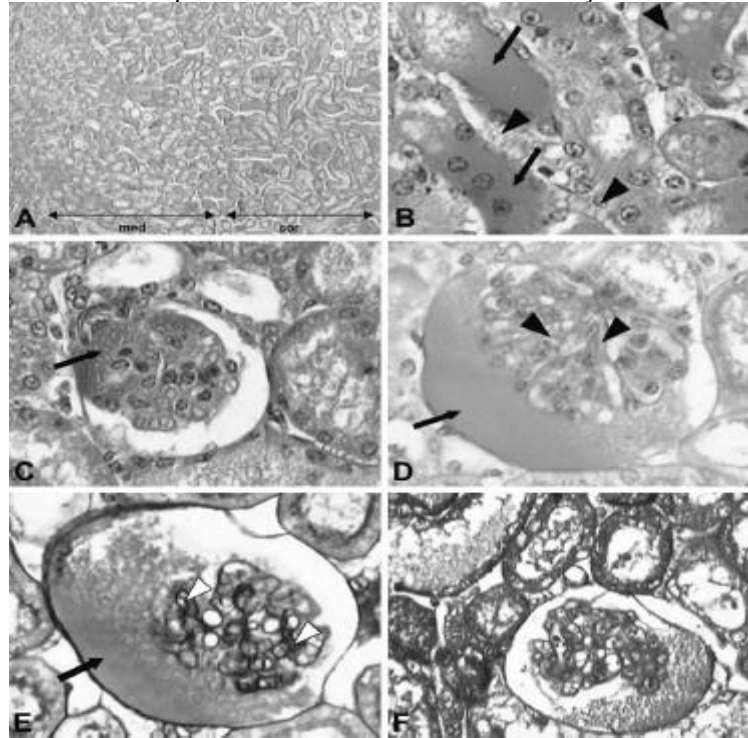
No que diz respeito aos achados clínicos, a peçonha causa diminuição da filtração glomerular e do volume urinário, aumento da resistência vascular renal e elevação significativa da enzima creatinofosfoquinase (CPK), além da liberação de mioglobina, que pode resultar em rabdomiólise. Em um estudo caso-controle realizado, identificou-se que no grupo no qual se inoculou a peçonha, houve aumento da mioglobina, deposição focal desse pigmento e menor incidência de mioglobina intersticial^[9] (Figura 3).

Figura 1. Coloração de hematoxilina-eosina evidenciando glomérulo em desintegração e dano tubular.



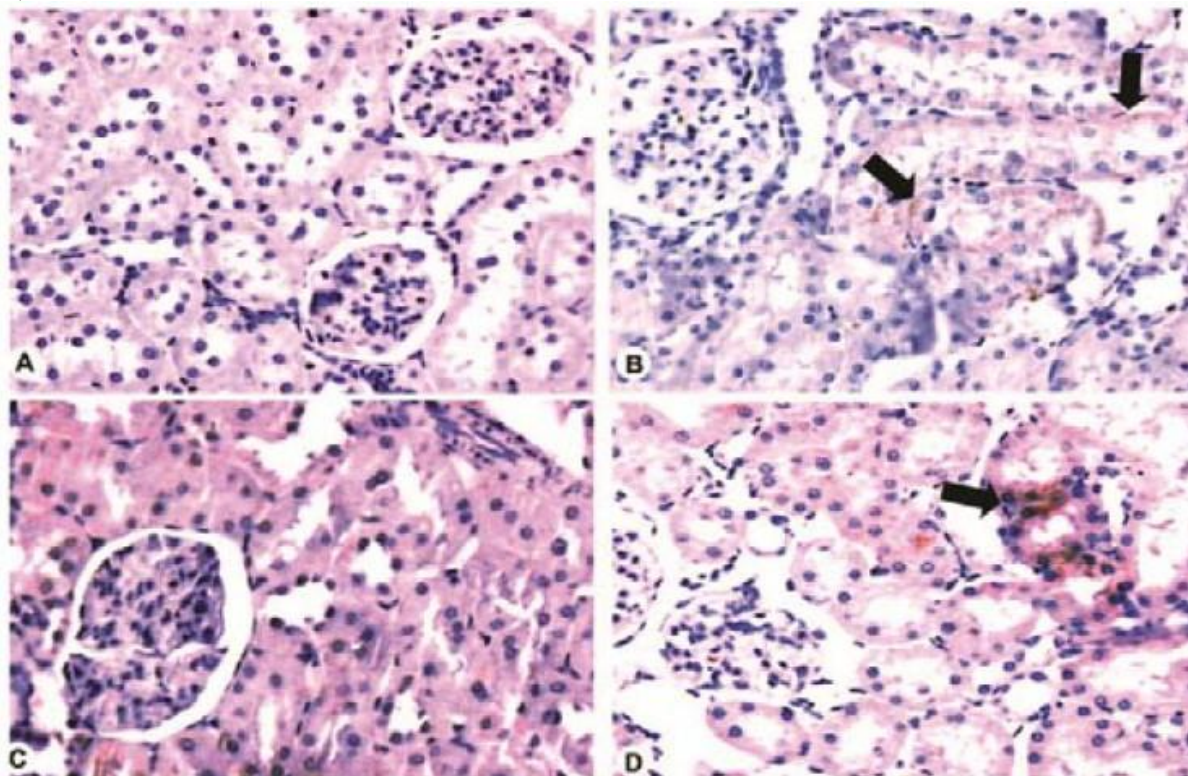
FONTE: Anwar S, Torosyan R, Ginsberg C, Liapis H, Morrison AR. **Clinicopathological course of acute kidney injury following brown recluse (*Loxoscles reclusa*) envenomation.** Clin Kidney J. 2013 Dec;6(6):609-12. doi: 10.1093/ckj/sft111. Epub 2013 Oct 1. PMID: 26120457; PMCID: PMC4438362.

Figura 2. (A) Visão panorâmica de um rim corado com hematoxilina e eosina, indicando alterações difusas ao longo das regiões medular (med) e cortical (cor). (B) Detalhes das estruturas tubulares coradas com hematoxilina e eosina, mostrando acúmulo de material eosinofílico no lúmen tubular (setas) e vacúolos nas células epiteliais ("triângulos"). (C) Corte transversal de estruturas glomerulares coradas com hematoxilina e eosina, onde intra-eritrócitos glomerulares podem ser vistos no espaço de Bowman (seta). (D,E) Seções transversais glomerulares coradas com reagente de Schiff de ácido periódico mais impregnação de hematoxilina e prata, onde colapso das membranas basais (pontas de seta) e deposição de materiais proteináceos no espaço de Bowman (setas) podem ser observadas. (F) Corte transversal de estruturas glomerulares e tubulares coradas pelo método de Rosenfeld sem infiltração leucocitária.



FONTE: Luciano MN, da Silva PH, Chaim OM, dos Santos VL, Franco CR, Soares MF, Zanata SM, Mangili OC, Gremski W, Veiga SS. **Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue.** J Histochem Cytochem. 2004 Apr;52(4):455-67. doi: 10.1177/002215540405200404. PMID: 15033997.

Figura 3. A - Coloração negativa para mioglobina (200 X). B. Citoplasma tubular positivo coloração para mioglobina (setas pretas). Notar necrose tubular na mesma área (200X). C. Coloração negativa para hemoglobina (200 X). D. Positivo coloração do citoplasma tubular (setas pretas) para hemoglobina (200 X).



FONTE: Lucato RV Jr, Abdulkader RC, Barbaro KC, Mendes GE, Castro I, Baptista MA, Cury PM, Malheiros DM, Schor N, Yu L, Burdmann EA. *Loxosceles gaucho venom-induced acute kidney injury--in vivo and in vitro studies*. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(5):e1182. doi: 10.1371/journal.pntd.0001182. Epub 2011 May 31. PMID: 21655312; PMCID: PMC3104973.

4 DISCUSSÃO

As fosfolipases tipo D, conhecidas como toxina dermonecrótica, mesmo que em menor proporção, são a principal fração da peçonha da aranha-marrom devido a sua importante relação com as manifestações locais e sistêmicas no organismo^[4]. Essa proteína tem como principal ação a hidrólise da esfingomielina, componente da membrana externa do eritrócito^[7].

Essa enzima provoca a morte de células renais humanas por apoptose, concomitante à ativação e secreção de metaloproteases (MMP) de matriz extracelular, tipo 2 e tipo 9, secretadas por células *human kidney* (HK-2)^[4]. Dois subtipos de metaloproteases foram identificados na peçonha loxoscélica: loxolisina tipo A, com atividade em fibronectina e fibrinogênio, e loxolisina tipo B, com atividade gelatinolítica^[5]. Estudo feito com coelho vivo reforça que a fosfolipase-D induz o aumento da secreção de MMP e que isso se correlaciona diretamente com a perda de viabilidade celular por apoptose^[4].

Em relação à ação das fosfolipases-D da aranha-marrom, sabe-se que elas catalisam a hidrólise de fosfolipídios, como a esfingomiéline nos eritrócitos, em uma ligação fosfodiéster terminal para liberar colina e produzir ceramida 1-fosfato (C1P)^[5]. Esta, em baixas concentrações, estimula a proliferação celular e inibe a apoptose, enquanto em concentrações relativamente mais altas induz à morte celular programada^[4]. Ao hidrolisar fosfolipídios, postula-se que a toxina dermonecrótica ativa vias de sinalização em diferentes células e causa alterações fisiopatológicas como a resposta inflamatória, agregação plaquetária e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos^[7].

Análises de células renais caninas (MDCK) mostraram que a peçonha é tóxica para as células renais humanas, causando 30 a 40% de morte celular após 72 horas. A fosfolipase-D foi a fração mais tóxica, resultando em 100% de morte celular em 72 horas, com concentração de apenas 5 microgramas^[4].

Através de um método de imunofluorescência, foi detectado que a toxina se ligou aos glomérulos e túbulos renais dos camundongos expostos^[11], reforçando a ideia de que a fosfolipase-D tem relação direta com a lesão renal aguda. A peçonha inibe, efetivamente, a ligação de anticorpos ao rim, agindo como “antígenos plantados” ligados às estruturas renais, como ao longo das membranas basais renais, o que pode explicar a lesão das células epiteliais glomerulares, a citotoxicidade das células endoteliais fenestradas, a hialinose e a proteinúria, bem como a lesão das células tubulares^[10].

A análise morfológica mostrou que 75-80% da área renal foi afetada pela peçonha de *Loxosceles spp.*^[10]. Em microscopia eletrônica, outra evidência de dano glomerular foi fornecida por sinais estruturais de citotoxicidade em podócitos, como danificação de pé e fendas de filtração^[15]. As células endoteliais fenestradas também mostraram sinais de alterações, como mudanças específicas na adesão celular, deslocamento da membrana basal, desorganização da fenestra, retração celular e indução à apoptose celular do endotélio capilar^[10, 5].

A LRA é definida como a destruição das células epiteliais tubulares e supressão aguda da função renal^[4]. Há evidências de que ela pode ser causada, indiretamente, pela peçonha de *Loxosceles spp.* através da hemólise intravascular. A atividade hemolítica libera grande quantidade de hemoglobina no sangue, o que pode ser tóxico para os rins (8, 18)^[4, 16]. A hemoglobina é filtrada pelos glomérulos renais e degradada pelas células epiteliais tubulares, resultando em dois compostos: tetrapirrol-heme e proteína-globina^[17]. O excesso de heme intracelular é citotóxico para essas células epiteliais^[17], o que corrobora para lesão renal aguda. Esse processo é chamado de nefropatia

pigmentosa^[16].

Em um relato de caso, um homem de 23 anos foi picado por uma aranha *Loxosceles spp.* e, em seguida, apresentou LRA e baixos níveis séricos de hemoglobina (6.2 g/dl), ao mesmo tempo em que não possuía alterações nos níveis de CPK sérico, nem mioglobinúria, ou seja, não apresentou rabdomiólise. Tendo essas condições em vista, provavelmente, a LRA foi causada exclusivamente por hemólise^[18].

A rabdomiólise causada pela peçonha da aranha-marrom^[9] libera mioglobina que também pode ser filtrada e absorvida pelo tecido renal^[16, 17, 19]. Em um estudo observacional retrospectivo, a mioglobina foi identificada no tecido renal por imunocoloração em pacientes com LRA^[17, 19]. Portanto, a rabdomiólise também pode induzir à LRA. Durante a elaboração desta revisão, destacou-se a compreensão dos mecanismos pelos quais a peçonha de aranhas do gênero *Loxosceles* age para causar os diversos efeitos deletérios em seres humanos. As toxinas dessas aranhas possuem atividades citotóxica, hemolítica e nefrotóxica. Em sua composição, pode-se encontrar enzimas como fosfolipases-D, que possuem propriedades hemolíticas e dermonecroticas^[6], metaloproteases, capazes de lesar vasos sanguíneos e promover a formação de trombos^[4, 13, 14], hialuronidases^[20] e outras proteínas.

REFERÊNCIAS

- 1- Silva SO, Guimarães AEA, Alves AE, Araújo SS, Rodrigues AVS, Mourão PA, Queiroz PS. [Internet] [acesso em 7 Abr 2022]. **Caracterização do acidente causado por aranha-marrom (Loxosceles)**. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/aranha-marrom>
- 2- Okamoto CK, van den Berg CW, Masashi M, Gonçalves-de-Andrade RM, Tambourgi DV. **Tetracycline Reduces Kidney Damage Induced by Loxosceles Spider Venom**. *Toxins* (Basel). 2017 Mar 2;9(3):90. doi: 10.3390/toxins9030090. PMID: 28257106; PMCID: PMC5371845.
- 3- **SINANWEB - Página inicial [Internet]** [acesso em 7 Abr 2022]. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/>
- 4- Albuquerque PLMM, Tessarolo LD, Menezes FH, Lima TB, Paiva JHHGL, Silva Júnior GBD, Martins AMC, Daher EF. **Acute kidney injury due to systemic Loxoscelism: a cross-sectional study in Northeast Brazil**. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018 Sep-Oct;51(5):695-699. doi: 10.1590/0037-8682-0465-2017. PMID: 30304281.
- 5- Chaves-Moreira D, Senff-Ribeiro A, Wille ACM, Gremski LH, Chaim OM, Veiga SS. **Highlights in the knowledge of brown spider toxins**. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017 Feb 8;23:6. doi: 10.1186/s40409-017-0097-8. PMID: 28194160; PMCID: PMC5299669.
- 6- Tambourgi DV, Magnoli FC, van den Berg CW, Morgan BP, de Araujo PS, Alves EW, Da Silva WD. **Sphingomyelinases in the venom of the spider Loxosceles intermedia are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis**. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Oct 9;251(1):366-73. doi: 10.1006/bbrc.1998.9474. PMID: 9790962.
- 7- Chaves-Moreira D, Chaim OM, Sade YB, Paludo KS, Gremski LH, Donatti L, de Moura J, Mangili OC, Gremski W, da Silveira RB, Senff-Ribeiro A, Veiga SS. **Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom**. *J Cell Biochem*. 2009 Jul 1;107(4):655-66. doi: 10.1002/jcb.22148. PMID: 19455508.
- 8- Gremski LH, da Justa HC, da Silva TP, Polli NLC, Antunes BC, Minozzo JC, Wille ACM, Senff-Ribeiro A, Arni RK, Veiga SS. **Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D**. *Toxins* (Basel). 2020 Mar 6;12(3):164. doi: 10.3390/toxins12030164. PMID: 32155765; PMCID: PMC7150852.
- 9- Lucato RV Jr, Abdulkader RC, Barbaro KC, Mendes GE, Castro I, Baptista MA, Cury PM, Malheiros DM, Schor N, Yu L, Burdmann EA. **Loxosceles gaucho venom-induced acute kidney injury--in vivo and in vitro studies**. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e1182. doi: 10.1371/journal.pntd.0001182. Epub 2011 May 31. PMID: 21655312; PMCID: PMC3104973.
- 10- Luciano MN, da Silva PH, Chaim OM, dos Santos VL, Franco CR, Soares MF, Zanata SM, Mangili OC, Gremski W, Veiga SS. **Experimental evidence for a direct cytotoxicity of Loxosceles intermedia (brown spider) venom in renal tissue**. *J Histochem Cytochem*. 2004 Apr;52(4):455-67. doi: 10.1177/002215540405200404. PMID: 15033997.

- 11- Chaim OM, Sade YB, da Silveira RB, Toma L, Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C, Mangili OC, Gremski W, von Dietrich CP, Nader HB, Sanches Veiga S. **Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006Feb 15;211(1):64-77. doi: 10.1016/j.taap.2005.05.015. Epub 2005 Jul 11. PMID: 16005484.
- 12- Chaim OM, Trevisan-Silva D, Chaves-Moreira D, Wille AC, Ferrer VP, Matsubara FH, Mangili OC, da Silveira RB, Gremski LH, Gremski W, Senff-Ribeiro A, Veiga SS. **Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes.** *Toxins (Basel).* 2011 Mar;3(3):309-44. doi: 10.3390/toxins3030309. Epub 2011 Mar 22. PMID: 22069711; PMCID: PMC3202818.
- 13- de Souza AL, Malaque CM, Sztajnbok J, Romano CC, Duarte AJ, Seguro AC. **Loxosceles venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury.** *Toxicon.* 2008 Jan;51(1):151-6. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.08.011. Epub 2007 Sep 2. PMID: 17928022.
- 14- Ribeiro de Oliveira-Mendes, B. B., Chatzaki, M., Sales-Medina, D. F., Leal, H. G., van der Veer, R., Biscoto, G. L., Rebello Horta, C. C. (2019). *From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: an overview focused on *Loxosceles similis*.* *Toxicon.* doi:10.1016/j.toxicon.2019.11.002.
- 15- Anwar S, Torosyan R, Ginsberg C, Liapis H, Morrison AR. **Clinicopathological course of acute kidney injury following brown recluse (*Loxosceles reclusa*) envenomation.** *Clin Kidney J.* 2013 Dec;6(6):609-12. doi: 10.1093/ckj/sft111. Epub 2013 Oct 1. PMID: 26120457; PMCID: PMC4438362.
- 16- Giuliani KTK, Kassianos AJ, Healy H, Gois PHF. **Pigment Nephropathy: Novel Insights into Inflammation-Mediated Pathogenesis.** *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 23;20(8):1997. doi: 10.3390/ijms20081997. PMID: 31018590; PMCID: PMC6514712.
- 17- Khalighi MA, Henriksen KJ, Chang A, Meehan SM. **Intratubular hemoglobin casts in hemolysis-associated acute kidney injury.** *Am J Kidney Dis.* 2015 Feb;65(2):337-41. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.08.020. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25441434.
- 18- Nag A, Datta J, Das A, Agarwal AK, Sinha D, Mondal S, Ete T, Chakraborty A, Ghosh S. **Acute kidney injury and dermonecrosis after *Loxosceles reclusa* envenomation.** *Indian J Nephrol.* 2014 Jul;24(4):246-8. doi: 10.4103/0971-4065.133017. PMID: 25097339; PMCID: PMC4119339.
- 19- Sakthirajan R, Dhanapriya J, Varghese A, Saravanakumar K, Dineshkumar T, Balasubramaniyan T, Gopalakrishnan N, Abraham Kurien A. **Clinical profile and outcome of pigment-induced nephropathy.** *Clin Kidney J.* 2018 Jun;11(3):348-352. doi: 10.1093/ckj/sfx121. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29942498; PMCID: PMC6007272.
- 20- Weber GC, Buhren BA, Schruppf H, Wohlrab J, Gerber PA. **Clinical Applications of Hyaluronidase.** *Adv Exp Med Biol.* 2019;1148:255-277. doi: 10.1007/978-981-13-7709-9_12. PMID: 31482503.