



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA
2008

DANIELE CHAVES MOREIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE *Loxosceles intermedia*
(ARANHA MARROM) E SEUS MECANISMOS MOLECULARES.**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e
Molecular, Curso de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Co-Orientador: Prof. Dr. Waldemiro Gremski**

**CURITIBA
2008**

Mestranda Bolsista (CAPES): Daniele Chaves Moreira
Curso de Pós – Graduação em Biologia Celular e Molecular
Período de Março de 2007 à Março de 2009
Departamento de Biologia Celular e Molecular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Profº. Dr. Silvio Sanches Veiga
Co-Orientador: Profº. Dr. Waldemiro Gremski

Nº. de Registro do Projeto de Pesquisa no BANPESQ/THALES: 2000008118

Nº. de Registro no Comitê de Ética de Experimentação em Animais (CEEAA): 245

Aprovado Registro no Comitê de Ética de Experimentação em Humanos
(CEP – Biológicas)

Aprovada progressão para Doutorado com projeto defendido: Data da qualificação
14/08/2008

CURITIBA
2008

Chaves-Moreira, Daniele

**ESTUDO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE
Loxosceles intermedia (ARANHA MARROM) E SEUS
MECANISMOS MOLECULARES.**

Curitiba, 2008.107p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular e Molecular.

1. Aranha Marrom. 2. *Loxosceles intermedia*. 3. Veneno. 4. Fosfolipase-D. 5. Catálise. 6. Hemólise.

Daniele Chaves Moreira

*Farmacêutica e Bioquímica graduada pela
Universidade Federal do Paraná (2002 – 2007).*

O trabalho desenvolvido não teria sido possível sem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), assim como do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Dedico este trabalho aos meus Pais:
Valkiria e Roberto, que dedicaram toda a vida aos
filhos. Aqueles que acreditam que a ousadia e o
amor são caminhos para as grandes realizações.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. Silvio Sanches Veiga, “*mestre inspirador*”, mais que um brilhante pesquisador e orientador, um exemplo a ser seguido. Pelo enriquecimento profissional, pessoal e pela paciência ao longo desses anos. Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa. Espero não ter desapontado, e gostaria de não ter passado despercebida. É com imensurável gratidão que levo comigo seu exemplo de dedicação e seriedade na pesquisa científica.

Ao Prof^o. Dr. Waldemiro Gremski, pela co-orientação de todos esses anos, mas, sobretudo pela amizade e pelo carinho. E principalmente pelo “dom” da Serenidade.

Às Doutoradas Andréa Senff Ribeiro, Olga Meiri Chaim e Juliana Ferreira de Moura, pela amizade e companhia valorosa, minha grande admiração por sua disposição. Pessoas peculiares que sempre me trataram com muito afeto e apoio científico, principalmente pela confiança em mim depositada e no meu trabalho.

A Prof^a. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco, pela alegria contagiante. Ao Prof^o. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, pelas dicas na Imunofluorescência. A Prof^a. Dra. Lucélia Donatti, pelo apoio na microscopia eletrônica. Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, tão solícitos em prestar auxílio e esclarecimentos sempre que eu os procurava, em especial, a Prof^a. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire, Prof^o. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, Prof^o. Dr. Stênio Perdigão Fragoso e Prof^o. Dr. Silvio Marques Zanata. Estendo os meus agradecimentos aos seus orientados dos respectivos laboratórios, em especial, às alunas: Aline, Michele, Rosana, Didi, Alda e aos alunos: Robson e Felipe pela atenção e simpatia de sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos: Ana Carolina, Ana Isabel, Anabel, Dilza, Fernanda, Fernanda Nunes Gabriel, Isabela, Jenifer, João, Kátia, Luíza, Luciellen, Paulo Henrique, Rafael, Reginaldo, Rodrigo, Thiago, Valéria, Youssef. Àqueles que estarão mais um tempo por lá e também àqueles que por aqui passaram e que já batem assas pela vida, a minha gratidão e meu carinho por absolutamente **todos** os momentos. Saibam que os terei sempre comigo, guardados do lado esquerdo do peito.

Em especial, à Márcia Helena Appel, uma mulher como poucas, cheia de sensibilidade, com o sorriso que é capaz de fazer esquecer qualquer problema. Uma mãe para muitos, uma amiga para todos. E também à minha querida amiga, não apenas de fila do Restaurante Universitário, Josiana Kusma, mas também pela amizade, cumplicidade e companheirismo.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular da UFPR pela agradável convivência durante estes anos, em especial, aos colegas do IBMP no TECPAR, onde sempre fui muito bem recebida.

Àqueles Amigos que, gentilmente, doaram sangue para a execução dos experimentos, em especial ao Pedro Michelotto, pela doação dos eritrócitos de cavalo.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo empenho na melhoria deste curso.

À Secretária do Curso de Pós-Graduação, Marlene B. de Camargo, pela incansável disposição.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e seus dedicados funcionários, pelo fornecimento e manutenção dos animais utilizados neste trabalho e a atenção de sempre. Em especial ao Luiz, que sempre me atendeu com muita boa vontade.

Às minhas eternas amigas Caroline, Giovanna, Grace, Juliana Pamplona e Vivian, que sempre incentivaram e participaram da realização de um sonho, que é a UFPR. Muito Obrigada pela nossa "terapia em grupo" me fazendo rir das coisas boas e também dos dramas - até porque é bom saber rir das nossas próprias trapalhadas. E me orgulho de poder manter essa amizade de tantos anos.

A todos os meus familiares, tios, tias, primos e primas, dindo, dinda, por sempre acreditarem em mim e proporcionarem tantos momentos felizes na minha vida. Em especial à minha primuska Patrícia, pelo ombro amigo e fiel.

Aos meus pais agradeço a vocês por tudo que hoje sou pelos valores morais e amor incondicional. Se hoje eu sou uma mulher independente, de caráter e personalidade é porque me ensinaram assim.

À minha mãe, uma mulher lutadora, capaz de enfrentar o mundo se for preciso para defender seu marido e filhos, mas sobre tudo uma flor muito delicada, a mais linda que há no meu jardim.

Ao meu pai, pela vida, pela atenção, por me fazer enxergar a verdade, a aceitar o que sou e buscar meus objetivos. E principalmente, OBRIGADA por ter me dado a oportunidade de ser um pedacinho de você e por ser um pedaço de mim.

Ao meu único Irmão, Roger, pelo apoio e amizade.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado e espero que de alguma forma possa retribuir toda a atenção e respeito.

"Possuímos em nós mesmos, pelo pensamento e a vontade, um poder de ação que se estende muito além dos limites de nossa esfera corpórea".
(Allan Kardec)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE GRÁFICOS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	3
1.2 Epidemiologia	7
1.3 Acidente loxoscélico	10
1.4 Características bioquímicas do veneno loxoscélico	15
1.5 Fosfolipases – D (PLD)	18
1.6. O Eritrócito	21
1.7 A Atividade hemolítica do veneno	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivos Gerais	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Material	32
3.1.1 Reagentes	32
3.1.2 Animais	32
3.2 Métodos	33
3.2.1 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque	33
3.2.2 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	33
3.2.3 Obtenção de eritrócitos humanos.....	33
3.2.4 Expressão de proteínas recombinantes a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de aranha marrom (<i>Loxosceles intermedia</i>).....	34
3.2.5 Purificação das proteínas recombinantes em resina Ni-NTA agarose...	35
3.2.6 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	37
3.2.7 Dose-resposta e Tempo-dependência da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e veneno de <i>L. intermedia</i>	37
3.2.8 Inibição da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1.....	38
3.2.9 Avaliação da interferência dos sistemas ABO e Rh na hemólise direta.....	38
3.2.10 Verificação da atividade hemolítica direta sobre eritrócitos de diferentes animais	39
3.2.11 Análise morfológica dos eritrócitos	39
3.2.12 Análise Ultraestrutural dos Eritrócitos.....	40
3.2.13 Alteração do tamanho eritrócitário	40
3.2.14 Análise da ligação da LiRecDT1-GFP	41
3.2.15 Ensaio de imunofluorescência.....	41
3.2.16 Ensaio para a marcação de microdomínios lipídicos.....	42
3.2.17 Análise da expressão de fosfatidilserina.....	43

3.2.18 Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Expressão heteróloga de toxinas em sistemas procarióticos.....	44
4.2 Curva dose-resposta da atividade hemolítica direta do veneno de <i>L. intermedia</i> e da toxina recombinante LiRecDT1	45
4.3 Tempo–dependência da atividade hemolítica direta do veneno de <i>L. intermedia</i> e da toxina recombinante LiRecDT1	46
4.4 Curva dose-resposta e curva tempo-dependente da atividade hemolítica direta da LiRecDT1 e da LiRecDT1 H12A	48
4.5 Inibição da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1 por agentes quelantes de cátions divalentes.....	51
4.6 Avaliação da interferência dos sistemas ABO e Rh na Atividade hemolítica.....	53
4.7 Verificação da atividade hemolítica direta sobre eritrócitos de diferentes animais.....	54
4.8 Análise morfológica dos eritrócitos.....	56
4.9 Análise ultraestrutural dos eritrócitos.....	59
4.10 Alteração do tamanho eritrócitário.....	62
4.11 Análise da ligação da LiRecDT1-GFP.....	64
4.12 Ensaios de imunofluorescência.....	64
4.13 Ensaio para a marcação de microdomínios lipídicos.....	66
4.14 Análise da expressão de fosfatidilserina.....	69
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA: Albumina de soro bovino
- B.O.D: Biological oxygen demand (Estufa incubadora microprocessada)
- C1P: Ceramida-1-fosfato
- cDNA: DNA complementar
- CEEA: Comissão de ética e experimentação animal
- COBEA: Colégio brasileiro de experimentação animal
- EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético
- GPCRs: receptores celulares para fosfolipídios associados à proteína G
- IgG: Imunoglobulina do Tipo G
- IRA: Insuficiência renal aguda
- kDa: Quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons).
- LALP: Metalo protease do tipo astacina.
- LiRecDT: *Loxosceles intermedia* dermonecrotic recombinant toxin.
- LPA: Ácido lisofosfatídico
- LPC: Lisofosfatidilcolina
- MDCK: Madin-Darby canine kidney epithelial cell line
- µg: Microgramas
- mL: Mililitro
- mM: Milimolar
- µL: Microlitro
- PAGE-SDS: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
- pH: Potencial hidrogeniônico
- PLD: Fosfolipase-D
- PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoreto
- RAEC: Rabbit aortic endothelial cell line
- SFB: Soro fetal bovino
- S1P: Esfingosina-1-fosfato
- SM: Esfingomielina
- SMase-D: Atividade esfingomielinásica-D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aranha marrom gênero *Loxosceles* sp.

Figura 2: Aranhas da espécie *Loxosceles intermedia*.

Figura 3: Mapas da distribuição das espécies de *Loxosceles intermedia* por municípios do Estado do Paraná.

Figura 4: Mapa da distribuição dos acidentes loxoscélicos por coeficiente de incidência média nos municípios do Estado do Paraná, registrados de 1993 a 2000.

Figura 5: Lesão causada pela picada de Aranha marrom (*Loxosceles* sp.).

Figura 6: Representação em fita da PLD de *Loxosceles laeta*.

Figura 7: Mecanismo catalítico da PLD.

Figura 8: Seqüência de alterações morfológicas dos eritrócitos.

Figura 9: Estrutura química dos lisofosfolipídios sinalizadores LPA e SIP.

Figura 10: Via geral de sinalização por LPA e SIP. Interação do LPA e SIP com receptores associados à proteína G e subsequente produção de segundos mensageiros e moléculas efetoras.

Figura 11: Análise da expressão da toxina recombinante LiRecDT1 em SDS-PAGE corado por Coomassie blue.

Figura 12: Alteração morfológica dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante LiRecDT1.

Figura 13: Alteração morfológica dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A.

Figura 14: Análise ultra-estrutural dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1.

Figura 15: Análise ultra-estrutural dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina mutada recombinante LiRecDT1 H12A.

Figura 16: Detalhe da Análise ultra-estrutural dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia*

Figura 17: Alteração do tamanho dos eritrócitos tratados com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante LiRecDT1.

Figura 18: Interação da toxina recombinante LiRecDT1-GFP com eritrócitos humanos.

Figura 19: Veneno de *L. intermedia* e toxina recombinante LiRecDT1 ligam-se sobre a superfície dos eritrócitos humanos.

Figura 20: Veneno de *L. intermedia* e toxina mutada recombinante LiRecDT1 H12A ligam-se sobre a superfície dos eritrócitos.

Figura 21: Reorganização dos microdomínios lipídicos dos eritrócitos humanos.

Figura 22: Efeito do veneno de *L. intermedia* e das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A sobre assimetria da membrana eritrocitária.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* (Aranha Marrom), presentes no Brasil.

Tabela 2: Evolução da lesão em função do tempo após o acidente loxoscélico.

Tabela 3: Acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* classificação quanto à gravidade, manifestações clínicas tratamento geral e específico.

Tabela 4: Composição fosfolipídica de eritrócitos de alguns mamíferos.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Número de acidentes por animais peçonhentos em Curitiba – PR entre os anos de 2001 à 2007.

Gráfico 2: Número de acidentes apenas por Aranha Marrom em Curitiba – PR entre os anos de 2001 à 2007.

Gráfico 3: Número de acidentes apenas por Aranha Marrom no Estado do Paraná entre os anos de 2004 à 2006.

Gráfico 4: Hemólise direta do veneno de *L. intermedia* e da toxina recombinante LiRecDT1.

Gráfico 5: Cinética da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1.

Gráfico 6: Hemólise direta da LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A.

Gráfico 7: Cinética da toxina recombinante LiRecDT1 H12A.

Gráfico 8: Interferência de quelantes na atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1.

Gráfico 9: Influência dos Sistemas ABO e Rh na atividade hemolítica direta da toxina LiRecDT1.

Gráfico 10: Atividade hemolítica direta da LiRecDT1 sobre diferentes eritrócitos.

RESUMO

As aranhas marrons estão distribuídas mundialmente e os acidentes relacionados são considerados um problema de saúde pública, especialmente na América do Sul, os quais são denominados como Loxoscelismo. Após os acidentes, as vítimas apresentam lesões cutâneas necróticas ao redor da picada e, em menor frequência, sinais sistêmicos tais como insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada e hemólise. Neste presente trabalho, nós estudamos o mecanismo molecular pelo qual uma toxina recombinante purificada e obtida da glândula do veneno, a qual é caracterizada bioquimicamente como uma fosfolipase-D, induz hemólise. O tratamento de eritrócitos provenientes de sangue humano com a toxina induziu experimentalmente hemólise direta de modo concentração- e tempo-dependentes. Os eritrócitos expostos à toxina fosfolipase-D recombinante apresentaram alterações morfológicas no tamanho e na forma das células de modo tempo-dependente. Além disso, a hemólise não foi dependente do grupo ABO e sistema Rh, uma vez que os eritrócitos humanos de diferentes grupos sanguíneos tratados com a toxina recombinante sofreram hemólise de uma maneira semelhante. A lise direta dos eritrócitos induzida pela fosfolipase-D recombinante depende da espécie do animal testado, já que eritrócitos obtidos a partir de humanos, de coelhos e de carneiros sofreram hemólise em uma porcentagem muito superior do que a observada com eritrócitos de cavalo. Em ensaios de microscopia confocal e imunofluorescência indireta, bem como na citometria de fluxo, seja utilizando anticorpos contra a fosfolipase-D, ou uma proteína fusão recombinante GFP-fosfolipase-D mostraram a ligação direta da toxina à membrana dos eritrócitos humanos. Além disso, eritrócitos incubados com a toxina recombinante reagiram com anexina-V e tiveram alteração do seu perfil de distribuição dos microdomínios lipídicos, corroborando com uma mudança no conteúdo de fosfolipídios da membrana tratada, que passou a expor na superfície celular um fosfolipídio carregado negativamente, a fosfatidilserina, mostrando também uma reorganização dos componentes da membrana lipídica. Adicionalmente, três quelantes de íons divalentes (EGTA, EDTA e 1,10-fenantrolina) inibiram significativamente a hemólise induzida pela fosfolipase-D (a qual contém magnésio, no domínio catalítico), em comparação ao PMSF, um inibidor de serino-protease, que não teve efeito sobre hemólise, sugerindo que a catálise está envolvida na hemólise. Finalmente, usando uma fosfolipase-D recombinante com mutação sítio-dirigida no domínio catalítico, na qual foi substituída a histidina da posição 12 por uma alanina, a hemólise e as alterações morfológicas dos eritrócitos foram completamente inibidas. No entanto, a toxina mutada não perdeu a capacidade de ligar-se à superfície dos eritrócitos, o que reforça a idéia do envolvimento da atividade catalítica da enzima no efeito hemolítico e nas alterações celulares, mas não apenas vinculada à ligação da toxina na superfície celular. Desse modo, os resultados aqui descritos fornecem evidências de que a fosfolipase-D do veneno de *L. intermedia* desencadeia a hemólise direta sobre de eritrócitos humanos de maneira dependente da atividade catalítica.

Palavras-chave: Aranha Marrom, *Loxosceles intermedia*, Veneno, Fosfolipase-D, Catálise, Hemólise.

ABSTRACT

Brown spiders have world-wide distribution and accidents that are considered health problem especially in South America are named loxoscelism. Victims followed accidents present necrotic cutaneous lesions surrounding the bites and in a less intensity systemic signs such as renal failure, disseminated intravascular coagulation, and hemolysis. Here, we studied the molecular way by which a purified recombinant toxin from the venom gland, biochemically characterized as phospholipase-D, causes hemolysis. Toxin treatment of human blood erythrocytes experimentally induced direct hemolysis in a dose-dependent concentration manner and in a time-dependent way. Erythrocytes exposed to the recombinant phospholipase-D toxin showed morphological changes in size and shape of cells in a time-dependent manner. Also, hemolysis was not dependent of ABO group and Rhesus systems, since human erythrocytes from all blood group treated by recombinant toxin suffered hemolysis in a similar manner. The direct lysis of erythrocytes evoked by recombinant phospholipase-D depends on animal species tested, since erythrocytes from human, rabbit and sheep suffered hemolysis in higher percentage than horse erythrocytes. Confocal microscopy and immunofluorescence assay using antibodies against phospholipase-D, as well as cell cytometry and confocal microscopy using a recombinant fusion GFP-phospholipase-D protein supported the direct binding of toxin to membrane of human erythrocytes. Moreover, erythrocytes treated by recombinant toxin reacted with annexin-V and had their lipid rafts profile altered, supporting for a changing in the phospholipid membrane content of treated cells exposing negatively charged phosphatidylserine at the cell surface, and for a reorganization of membrane lipid components. Additionally, three divalent ion chelators (EGTA, EDTA and 1,10-phenanthroline), significantly inhibited hemolysis evoked by phospholipase-D (that has magnesium at the catalytic domain), as compared to PMSF a serine-protease inhibitor that had no effect upon hemolysis, suggesting catalysis as involved upon hemolysis. Finally, by using a site directed mutated recombinant phospholipase-D at the catalytic domain, substituting histidine at position 12 by alanine, the hemolysis and morphologic changes of erythrocytes were completely inhibited, but not the toxin binding on the erythrocytes surface, supporting that the catalytic activity of enzyme is involved on hemolysis and cellular alterations but not on the toxin cell binding. Thus, results described herein provide evidence that phospholipase-D from *L. intermedia* venom stimulates direct hemolysis upon human blood cells in a catalytic-dependent way.

Key words: Brown spider, *Loxosceles intermedia*, Venom, Phospholipase-D, Catalysis, Hemolysis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever as manifestações clínicas decorrentes da picada da aranha marrom, pertencente ao gênero *Loxosceles*. Esse quadro clínico é caracterizado pelo desenvolvimento de uma lesão dermonecrótica, com espalhamento gravitacional no local da picada (quadro cutâneo) e menos freqüentemente, por distúrbios hematológicos e disfunção renal, caracterizando um quadro sistêmico ou cutâneo-visceral (FUTRELL, 1992), o maior responsável pelos casos de óbitos.

Embora aranhas desse gênero apresentem ampla distribuição mundial e grande adaptação aos climas tropical, subtropical e temperado, nas últimas décadas observou-se elevada infestação intra-domiciliar e elevado número de casos de acidentes, principalmente ocorridos nas regiões sul e sudeste do Brasil. Entre 1989 e 1990, de todos os casos de loxoscelismo notificados no país, 77,4% deles ocorreram na cidade de Curitiba e região metropolitana (FUTRELL, 1992; YOUNG e PINCUS, 2001; RIBEIRO *et al.*, 1993), e cuja incidência se mantém.

O veneno desses aracnídeos é composto de várias toxinas, algumas das quais já foram caracterizadas bioquímica e biologicamente (Da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007b). Porém, o conteúdo exato do veneno de *Loxosceles* e os mecanismos pelos quais este induz as alterações deletérias observadas no loxoscelismo não estão totalmente esclarecidos e vários aspectos permanecem sob investigação.

De acordo com BRAVO e colaboradores (1993), o processo hemolítico é um dos fenômenos centrais do loxoscelismo sistêmico e muito da sintomatologia clínica apresentada se deve a esse efeito do veneno sobre os eritrócitos. O mecanismo pelo qual o veneno desencadeia hemólise intravascular permanece desconhecido e as pesquisas sobre este tópico são extremamente contraditórias. TAMBOURGI e colaboradores (2002) verificaram que uma proteína de 35 kDa, purificada a partir do veneno extraído das glândulas de *Loxosceles intermedia*, atua sobre a superfície de eritrócitos humanos, provocando hemólise dependente de complemento. Esses autores acreditam que o veneno de *L. intermedia* aumenta a susceptibilidade da célula à lise mediada pelo complemento.

Os estudos sobre veneno de *Loxosceles reclusa* indicam que sua principal toxina apresenta características de uma fosfolipase-D (PLD) (LEE e LYNCH, 2005). Estas toxinas já foram caracterizadas bioquímica e biologicamente e são consideradas as grandes responsáveis pela dermonecrose e, portanto, chamadas de toxinas dermonecróticas (APPEL

et al., 2008). Estudos mostram várias isoformas de toxinas dermonecroticas presentes no veneno de *Loxosceles*, indicando que existe uma família de fosfolipases-D no veneno. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade biológica de toxinas dermonecroticas do veneno de *L. intermedia*. Para tanto, utilizou-se toxinas recombinantes, cujos clones foram obtidos a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*. Neste estudo, investigou-se a atividade biológica da toxina recombinante LiRecDT1, a primeira isoforma de fosfolipase-D encontrada por nosso grupo no veneno loxoscélico, avaliou-se também a atividade hemolítica direta do veneno de *L. intermedia* e a participação das toxinas dermonecroticas neste evento biológico. Na investigação do efeito hemolítico, utilizou-se também a toxina recombinante LiRecDT1 H12A, que contém uma mutação no sítio catalítico da enzima.

Os dados desse estudo foram importantes para melhor compreensão do evento hemolítico observado no loxoscelismo, além de propiciar novas informações sobre os possíveis mecanismos envolvidos na ação deletéria do veneno sobre os eritrócitos, que culminam na destruição prematura destas células.

1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família *Sicariidae*, composta por dois gêneros e 122 espécies (PLATNICK, 2007). Receberam o nome popular de aranha marrom por apresentarem coloração que varia do marrom claro ao escuro. A variabilidade nesta coloração pode auxiliar na identificação destas aranhas. Podem ser encontradas em diferentes latitudes, adaptadas a distintas condições ambientais das zonas de clima tropical e temperado do globo terrestre (TAVARES, 2007). Representantes deste gênero estão espalhadas pelos cinco continentes e há relatos em diferentes regiões do planeta de acidentes envolvendo estas aranhas com seres humanos, como por exemplo, no leste Europeu (BOGDAN *et al.*, 2005), no Oriente Médio (DYACHENKO *et al.*, 2006), na África (ATKINSON, 1990), na Oceania (HOGAN *et al.*, 2004), nas Américas do Norte (SWANSON e VETTER, 2006) e do Sul (SOUZA *et al.*, 2008).

No continente americano provavelmente se encontra a maior diversidade de espécies, sendo relatado cerca de 50 apenas na América do Norte (GOMEZ *et al.*, 2001) e cerca de 30 espécies na América do Sul (GERTSCH, 1967). Em algumas regiões do Brasil, Chile e Peru os acidentes provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* constituem um

significativo problema de saúde pública (SCHENONE, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; PETERSON, 2006; SOUZA *et al.*, 2008). Sabe-se atualmente da existência de 10 espécies de aranha marrom registradas no Brasil (Tabela 1) (PLATNICK, 2007), sendo que quatro ocorrem no estado do Paraná: *L. intermedia*; *L. gauch*o; *L. laeta* e *L. hirsuta* (MARQUES DA SILVA e FISCHER, 2000).

Espécies de Aranhas Marrom encontradas no Brasil

Loxosceles adelaida
Loxosceles amazonica
Loxosceles anomala
*Loxosceles gauch*o
Loxosceles hirsuta
Loxosceles immodesta
Loxosceles intermedia
Loxosceles laeta
Loxosceles puortoi
Loxosceles similis

Tabela 1: Aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* (Aranha Marrom), presentes no Brasil. Modificado a partir de PLATNICK, 2007.

A aranha marrom *Loxosceles intermedia* é a espécie predominante no município de Curitiba, estado do Paraná. Suas características específicas são: tamanho médio de 16 mm, poucos pêlos no corpo, coloração marrom-avermelhada, disposição característica dos pêlos na região do cefalotórax, presença de sulcos laterais menos curvos e presença de dois receptáculos seminais nas fêmeas (MELLO-LEITÃO, 1934).

Essas aranhas não são agressivas, possuem hábitos noturnos, são bastante sedentárias, sendo que a maioria dos acidentes ocorre quando as pessoas comprimem a aranha ao vestir-se, enxugar-se ou durante o sono, ocorrendo a picada no homem apenas como forma de defesa (FUTRELL, 1992). Elas podem ser encontradas em lugares escuros como, por exemplo, em telhas empilhadas, em entulhos e em restos de vegetais. Já no ambiente intra-domiciliar, essas aranhas podem ser encontradas atrás de quadros, de móveis e entre as roupas. Costumam se adaptar a lugares sombrios e com pouca higiene. Apresentam

teias irregulares, parecendo algodão esfiapado e pegajoso. Toleram temperaturas variando de 8 a 43° C e sobrevivem sem alimento por prolongados períodos de tempo (FUTRELL, 1992); (DA SILVA *et al.*, 2004). A aranha marrom alimenta-se de pequenos insetos e serve de alimento para anfíbios, répteis e aves. Ao atingirem um ano de vida, adquirem maturidade sexual (FISCHER, 1996).

Outra característica importante do gênero *Loxosceles*, é relativo ao número de olhos, seis divididos em 3 pares em forma de semi-circulo sobre o cefalotórax, que é baixo, não ultrapassa a linha do abdômen e que apresenta o desenho de um violino (Figura 1) (PETERSON, 2006).



Figura 1: Aranha Marrom gênero *Loxosceles* sp. Em detalhe a disposição dos 3 pares de olhos (estrela vermelha) e a forma de um violino sobre o cefalotórax (seta larga branca).

A aranha marrom apresenta dimorfismo sexual, sendo normalmente as fêmeas maiores que os machos (Figura 2). Estes apresentam palpos com os tarsos modificados, “os pedipalpos”, especializados na transferência de espermatozoides (GILBERT, 1997). A *L. intermedia* se reproduz, preferencialmente, nos meses mais quentes do ano, podendo depositar, em média, 20 ovos por postura (ANDRADE *et al.*, 1999), dos quais eclodem as aranhas jovens em 46 dias (FISCHER, 1996). A aranha fêmea constrói uma teia complexa, a

ooteca, em formato de saco, onde os ovos são acondicionados no momento da postura. Após a eclosão, as pré-larvas sofrem duas mudas antes de deixar a ooteca em busca de alimento (FISCHER, 1996).

Segundo MARCHIORO, FISCHER e MARQUES DA SILVA (2005) existe influência da alimentação monoespecífica no desenvolvimento pós-embriônico de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. De acordo com estes autores, filhotes dessas espécies de aranha, que foram alimentados com ninfas de *Pycnoscelus surinamensis* apresentam desenvolvimento mais rápido e maior número de ecdise, do que os alimentados com larvas de *Tenebrio molitor*.

A *L. intermedia* é por tanto, um animal rústico, que sobrevive bem à escassez de alimentos e grandes variações de temperatura. O aumento da sua população, observada em Curitiba e região metropolitana, é atribuído ao grande crescimento das cidades, com conseqüente destruição do seu *habitat* e desaparecimento de seus predadores naturais. Como resultado, desse desequilíbrio ambiental essas aranhas encontraram no ambiente domiciliar um excelente local para sua sobrevivência e reprodução, com conseqüente aumento dos casos de loxoscelismo no município de Curitiba e arredores, sendo hoje considerado um problema de saúde pública (MARQUES DA SILVA e FISCHER, 2000).

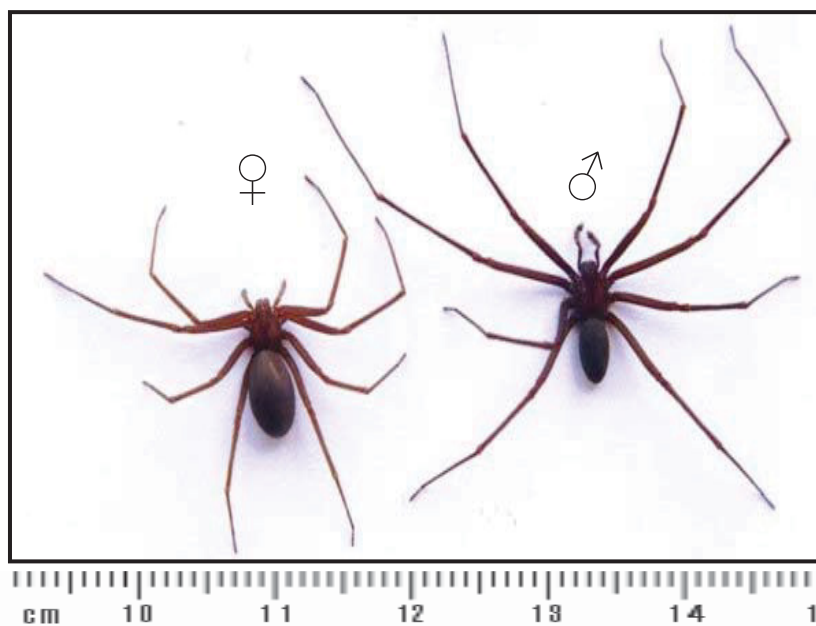


Figura 2: Exemplares fêmea e macho da *Loxosceles intermedia*. Modificado a partir de da SILVA *et al.*, 2004.

1.2 Epidemiologia

FURLANETTO (1961) abordou o problema do acidente loxoscélico no Brasil, apresentando os primeiros casos publicados suspeitos de terem sido causados por *Loxosceles* em 1915. O primeiro caso confirmado de loxoscelismo no Brasil foi diagnosticado no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, São Paulo, em 1954, descrito posteriormente por CARDOSO e DE CILLO (1990).

TORRES e CARLOTTO (1982) citaram que, na cidade de Porto Alegre no Rio Grande do Sul, as aranhas *Loxosceles* foram as responsáveis por 35,5% dos acidentes provocados por animais peçonhentos entre 1977 e 1981).

Na cidade de Curitiba, RIBEIRO e colaboradores (1993) analisaram 923 acidentes loxoscélicos ocorridos entre 1989 e 1990. Corresponderam a 52,7% dos acidentes por aracnídeos notificados no Estado do Paraná, sendo utilizada a soroterapia em 46,6% (730 casos). Esses mesmos autores verificaram que os acidentes ocorreram em todas as zonas urbanas da cidade e que a espécie predominante foi a *L. intermedia* (Figura 2). Além disso, esse tipo de acidente com animais peçonhentos representou o quinto agravo em notificação entre as cinco principais ocorrências, no Paraná em 1997. Atingindo o segundo lugar em 2001, sendo menor apenas que o atendimento anti-rábico humano. Essa segunda posição tem sido mantida até hoje (SMS/CE/CVE - SINAN, 2007). Ainda assim, neste mesmo ano, o município de Curitiba apresentou 76% do total de casos de loxoscelismo do Estado. Da mesma forma, registrou-se alta incidência desse tipo de acidente quando se analisou a 2ª Regional de Saúde, que compreende Curitiba e a Região Metropolitana. Mostrou-se também, que nove dos dez primeiros municípios em frequência de acidentes (92,9% do total) pertencem a essa regional de saúde (Figura 3) (MARQUES DA SILVA, 2002).

O recente Boletim Epidemiológico de Curitiba divulgou que ocorreram 2949 notificações de acidentes com animais peçonhentos apenas na capital do estado (Gráfico 1). Desse total, 2488 acidentes foram com a aranha marrom, significando 85% das notificações apenas em 2006 (Gráfico 2). Além disso, a Secretaria de Saúde divulgou também que em todo o estado do Paraná ocorreram 5373 casos de loxoscelismo em 2006, sendo que 46% do total de casos ocorreram apenas no município de Curitiba (Gráfico 3). Entretanto, quando levamos em consideração os dados epidemiológicos da 2ª Regional de Saúde, a estimativa cresce para aproximadamente 80% do total de casos de loxoscelismo do estado do Paraná (Figura 4). Esses dados comprovam que essa região compreende os municípios com maior

incidência de loxoscelismo do Estado. Esses dados justificam a necessidade do estudo da biologia da aranha marrom, das toxinas do seu veneno, assim como dos seus efeitos biológicos, uma vez que seus resultados poderão mais futuramente, contribuir de alguma forma para a prevenção de acidentes.



Figura 3: Mapas da distribuição das espécies de *Loxosceles intermedia* por municípios do Estado do Paraná. Modificado a partir de MARQUES DA SILVA, 2002.

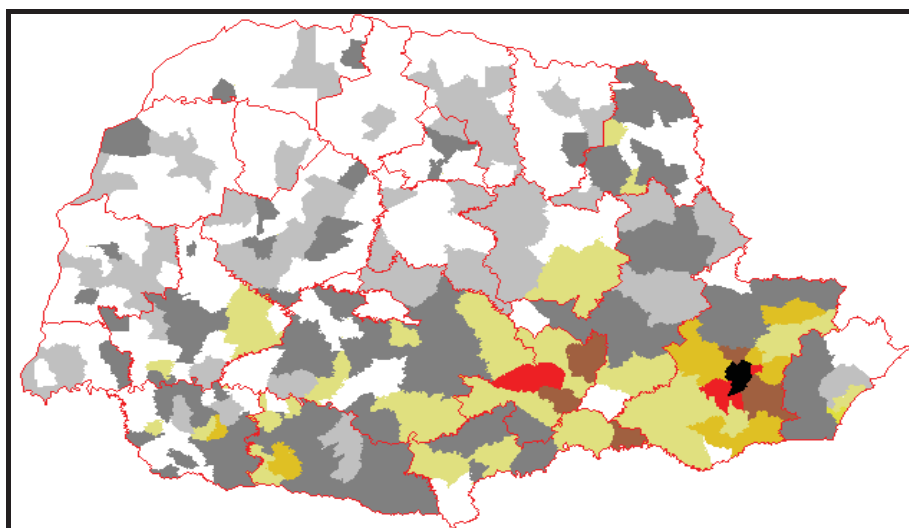
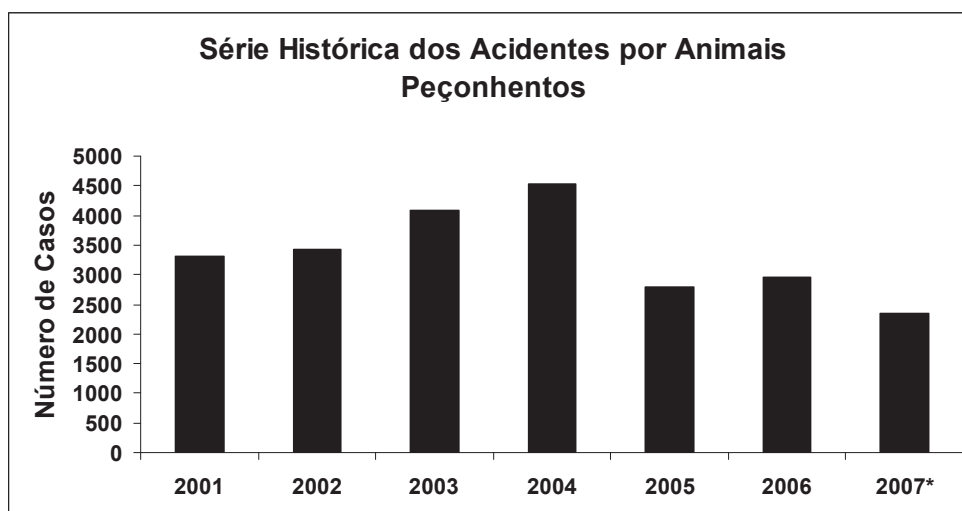


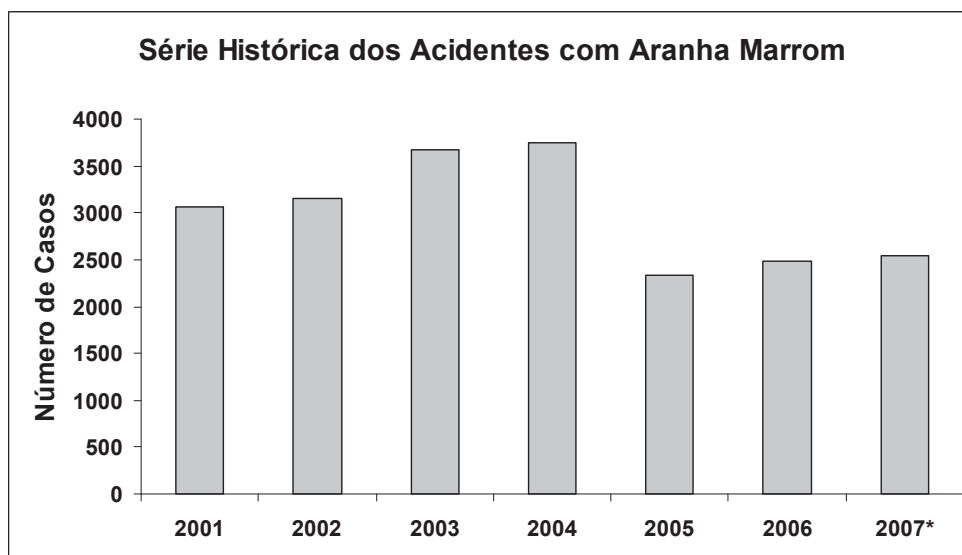
Figura 4: Mapa da distribuição dos acidentes loxoscélicos por coeficiente de incidência média nos municípios do Estado do Paraná, registrados de 1993 a 2000. Modificado a partir de MARQUES DA SILVA, 2002.



Ano	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007*
Nº de Casos	3316	3433	4074	4529	2805	2949	2336

Gráfico 1: Número de acidentes por animais peçonhentos em Curitiba – PR entre os anos de 2001 à 2007. Dados preliminares até 20/06/2007.

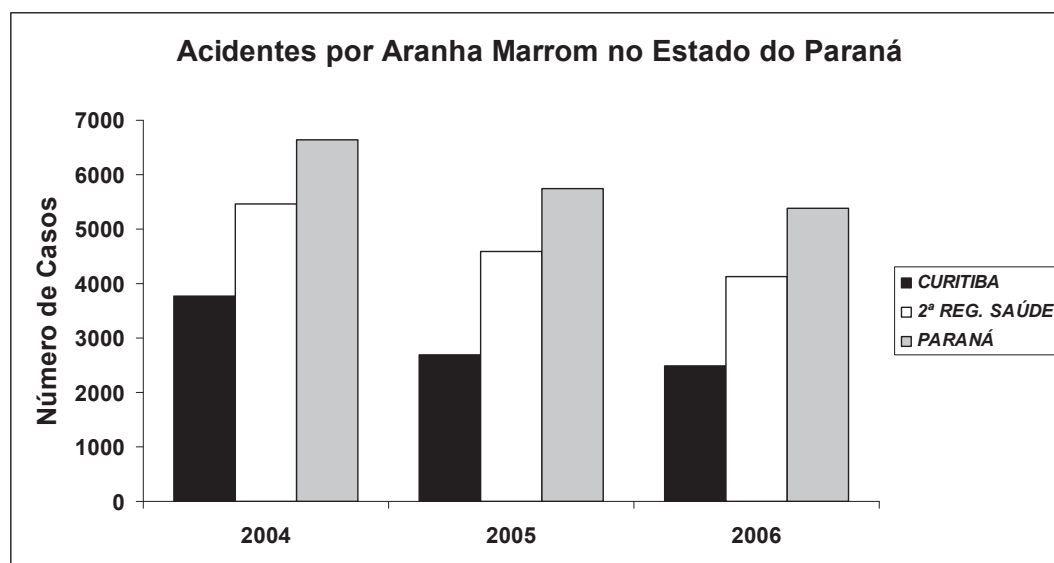
Fonte: SMS/CE/CVE – SINAN “Boletim Epidemiológico de Curitiba”.



Ano	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007*
Nº de Casos	3064	3152	3680	3744	2335	2488	2145

Gráfico 2: Número de acidentes apenas por Aranha Marrom em Curitiba – PR entre os anos de 2001 à 2007. Dados preliminares até 20/06/2007.

Fonte: SMS/CE/CVE – SINAN “Boletim Epidemiológico de Curitiba”.



	2004	2005	2006
<i>CURITIBA</i>	3769	2700	2482
<i>2ª REG. SAÚDE</i>	5462	4583	4119
<i>PARANÁ</i>	6632	5732	5373

Gráfico 3: Número de acidentes apenas por Aranha Marrom no Estado do Paraná entre os anos de 2004 à 2006.

Fonte: Secretária Estadual de Saúde Ambiental do Paraná (SESA), 2007.

1.3 Acidente loxoscélico

Como já anteriormente definido, o acidente loxoscélico ou loxoscelismo é a designação do quadro clínico desenvolvido por indivíduos picados por aranhas do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992). Esse quadro clínico provocado pelo envenenamento se manifesta de duas formas. Primeiro, como quadro cutâneo ou dermonecrótico (84 - 97% dos casos) e, segundo, como quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (3 - 16% dos casos) (BARBARO *et al.*, 1992). Os efeitos sistêmicos do envenenamento são potencialmente fatais, e devendo ser clinicamente abordados de forma rápida e objetiva (PETERSON, 2006). A gravidade do acidente e o desenvolvimento de determinado quadro clínico dependerá de fatores relacionados com a espécie de aranha marrom (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), seu sexo (OLIVEIRA *et al.*, 1999), o estágio de desenvolvimento (ANDRADE *et al.*, 1999) e a quantidade de veneno inoculado (SEZERINO *et al.*, 1998). Além disso, dependerá das características genéticas do indivíduo acidentado (BARRETO *et al.*, 1985), como o estado nutricional da vítima, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo que o acidentado

leva para obter tratamento correto (BARBARO *et al.*, 1994). Apenas uma picada pode ser suficiente para desencadear um quadro de envenenamento letal.

Os principais sinais clínicos apresentados na evolução do quadro clínico do loxoscelismo estão apresentados na Tabela 2. O quadro cutâneo é caracterizado por dermonecrose na região da picada (REES *et al.*, 1984). Esta lesão, por ser pouco dolorosa, não é percebida pelo indivíduo. Após 2 a 8 horas, surge a dor, que pode variar de moderada a severa, e é caracterizada por ser local e do tipo “queimação” ou ardência. Ocorrem também, prurido, edema, mal-estar geral e febre. Em seguida, pode surgir uma lesão circunscrita por halo vermelho, com uma zona pálida central, chamada de placa marmórea (FUTRELL, 1992). Após 3 a 5 dias do acidente, pode ocorrer acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose e formação de abscesso (FUTRELL, 1992). Em certos casos, a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas para formação de uma escara de difícil cicatrização, podendo originar seqüelas deformantes (PIZZI *et al.*, 1957).

A lesão pode ser agravada por uma infecção secundária, causada por microrganismos oriundos das quelíceras da aranha, que no momento da picada podem ser inoculados juntamente com o veneno. Um microorganismo presente nas quelíceras da aranha marrom é o *Clostridium perfringens*, bacilo gram positivo anaeróbico, considerado um importante agente de infecção secundária à picada pela aranha marrom (MONTEIRO *et al.*, 2002).

TEMPO	SINAIS CUTÂNEOS	SINAIS SISTÊMICOS	SINTOMAS
1-3 h	Formação de vesícula, eritema, cianose		Ausência de dor
3 - 12 h			Início da dor (Queimação) e Coceira
12-24 h	Edema, eritema, áreas hemorrágicas e isquemia		
24-72 h	Formação da placa marmórea	Erupção, Febre, Hemólise Intravascular, Trombocitopenia e CIVD*	Náusea, vômito, mialgia, calafrios, fraqueza
3-7 dias	Início da formação da úlcera, regressão do eritema	Anemia Hemolítica, Insuficiência Renal Aguda	
7-42 dias	Tamanho máximo da lesão		
7-120 dias	Gradual regressão da região		

Tabela 2: Evolução da lesão em função do tempo após o acidente loxoscélico. *CIVD, Coagulação intravascular disseminada. Adaptado de SAMS *et al.*, 2001.

Algumas vítimas podem desenvolver a forma mais grave de loxoscelismo, que corresponde ao quadro cutâneo-visceral ou sistêmico. Os sintomas sugestivos desse quadro são astenia, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléias, obnubação, convulsões e coma. Pode haver, também, “*rash*” cutâneo. A forma sistêmica pode ser acompanhada pela lesão dermonecrótica (FUTRELL, 1992); (BRAVO *et al.*, 1993). Nos casos mais graves ocorre anemia hemolítica, trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária (FUTRELL, 1979) (DA SILVA *et al.*, 2004) e coagulação intravascular disseminada “CIVD” (DENNY, DILLAHA e MORGAN, 1964). Esses eventos podem determinar diminuição do hematócrito, aumento da bilirrubina indireta, icterícia, petéquias, equimoses e hemoglobinúria, sinais clínicos que geralmente se instalam nas primeiras 24 horas após o acidente (FUTRELL, 1992); (PETERSON, 2006). Esse quadro clínico está sendo relacionado com os acidentes envolvendo a *L. laeta* (SCHENONE *et al.*, 1989). Não obstante, pode ocorrer também insuficiência renal aguda (IRA) de etiologia multifatorial, associada com a diminuição da perfusão renal, alterações vasculares nos pulmões e fígado (LUNG e MALLORY, 2000). A insuficiência renal aguda (IRA), associada à obstrução da luz tubular é a principal causa de morte nos acidentes loxoscélicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Os mecanismos moleculares que levam a IRA são desconhecidos. Entretanto, sabe-se que o veneno da glândula da *Loxosceles intermedia* tem atividade entactinolítica e degrada o domínio protéico do heparan-sulfato proteoglicano, considerado um importante constituinte molecular encontrado nas membranas basais, estruturas fundamentais dos glomérulos renais, envolvidos na formação da urina (VEIGA *et al.*, 1999; LUCIANO *et al.*, 2004). Neste contexto, estudos realizados “*in vivo*” e “*in vitro*” utilizando camundongos e a linhagem celular MDCK, mostraram que as toxinas do veneno de *L. intermedia* apresentam atividade nefrotóxica direta sobre o tecido renal (CHAIM *et al.*, 2006). Logo em seguida, KUSMA e colaboradores (2008) demonstraram que a isoforma recombinante de fosfolipase-D, LiRecDT1 foi capaz de desencadear efeito nefrotóxico direto, tal como o veneno bruto da glândula, sugerindo que essa nefrotoxicidade é dependente da atividade fosfolipásica da toxina.

Recentemente, tornou-se público um caso nacional de loxoscelismo sistêmico (SOUZA *et al.*, 2008), no qual foram observados os distúrbios críticos decorrentes do envenenamento por aranha marrom. A vítima apresentou hemólise intravascular, rabdomiólise, coagulopatia e insuficiência renal aguda, além do desenvolvimento de uma

lesão dermonecrótica, com espalhamento gravitacional no local da picada, como ilustrado na Figura 5.

Nesses casos existe a indicação de administração do soro anti-veneno (PAULI *et al.*, 2006). Dados experimentais revelam que a eficácia da soroterapia é reduzida após 36h da inoculação do veneno. As recomendações para utilização do soro anti-veneno dependem da gravidade das manifestações clínicas, como é ilustrado na Tabela 3. Além da soroterapia, tem sido recomendado o uso de corticosteróide local (como antiinflamatório) e por via sistêmica (para proteger a membrana do eritrócito). Também é utilizado a dapsona nas formas cutâneas graves, em associação com a soroterapia, como modulador da resposta inflamatória para redução do quadro local. A dose de dapsona utilizada se encontra no intervalo de 50 a 100 mg/dia, sendo administrada por via oral durante um período máximo de duas semanas. A dapsona pode desencadear metemoglobinemia, que deve ser monitorada laboratorialmente. Além disso, se existir evidências de hemólise intravascular, impõe-se hidratação adequada e alcalinização da urina, para prevenir a precipitação intra-tubular de hemoglobina. Isso seria um possível fator para desencadear necrose tubular aguda hemoglobinúrica (CUPO *et al.*, 2003).

Outros problemas decorrentes do consumo dos fatores de coagulação, como sangramentos causados pela trombocitopenia e hipofibrinogenemia, deverão ser tratados conforme a necessidade. Habitualmente, está indicada cuidadosa assepsia da lesão, elevação do membro atingido e realização de compressas frias. Muitas vezes, é necessária a intervenção cirúrgica para a realização dos debridamentos e até mesmo de enxertos de pele (CUPO *et al.*, 2003).

Em Curitiba, o tratamento estabelecido é a utilização de prednisona, dapsona e soro anti-*Loxosceles* produzido no Centro de Produção de Produtos Imunobiológicos (CPPI). O soro anti-*Loxosceles* é administrado apenas nos casos de loxoscelismo cutâneo-visceral e em que a aranha é identificada como *L. intermedia* ou *L. laeta*. Porém, o tratamento com prednisona deve ser iniciado, mesmo na ausência da lesão dermonecrótica. O monitoramento do paciente deverá ser realizado nas primeiras 36 horas e caso exista quadro cutâneo severo há indicação da dapsona e soro anti-*Loxosceles* (SMS/CE/CVE – SINAM, 2007). Se os sinais do quadro sistêmico não iniciam dentro de 24 horas, fica estabelecido o diagnóstico de quadro cutâneo e este tem bom prognóstico. Contudo, pacientes com sintomas de loxoscelismo sistêmico têm bom prognóstico se sobreviverem as primeiras 48 horas após o acidente (SCHENONE, 2003).

<i>Classificação</i>	<i>Manifestações Clínicas</i>	<i>Tratamento</i>
<i>Leve</i>	Lesão inaracterística, (sendo a <i>Loxosceles</i> identificada como causador do acidente), lesão local sugestiva, sem comprometimento do estado geral e sem alterações laboratoriais.	Sintomáticos: Analgésico, Antiinflamatório local e Acompanhamento até 72 h após picada
<i>Moderado</i>	Com ou sem identificação da <i>Loxosceles</i> no momento da picada, lesão sugestiva com <i>rash</i> cutâneo ou lesão característica < 3cm de diâmetro, com ou sem alterações sistêmicas e sem alterações laboratoriais, sugestivas de hemólise.	Prednisona (5 dias): Adultos 40 mg/dia e Crianças 1 mg/kg/dia SAAr ou SALox IV 5 ampolas
<i>Grave</i>	Lesão característica de instalação rápida (primeiras 36 h), com >3 cm de diâmetro, evidência de hemólise (palidez, anemia aguda, icterícia) confirmada laboratorialmente.	SAAr ou SALox IV: 5 ampolas (forma cutânea), 10 ampolas (forma cutâneo-visceral), Prednisona (7 a 10 dias): Adultos 40 mg/dia e Crianças 1 mg/kg/dia

Tabela 3: Acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* classificação quanto à gravidade, manifestações clínicas tratamento geral e específico. *SALox: Soro Antiloxoscélico; **SAAr : Soro Antiaracnídico.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2001.



Figura 5: Lesão causada pela picada de Aranha Marrom (*Loxosceles* sp.). (A) Edema, as vesículas, e as equimoses (seta amarela) desenvolvidas no local da picada de *Loxosceles* (região do tronco) (estrela branca). Uma marca característica da picada de *Loxosceles* é o espalhamento gravitacional (seta preta). (B) A lesão evoluiu para escara e necrose. Adaptado de SOUZA *et al.*, 2008.

1.4 Características bioquímicas do veneno loxoscélico

O veneno da “aranha-marrom” é um líquido protéico produzido pelas glândulas apócrinas situadas no cefalotórax do animal, as quais se comunicam com o exterior através do aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (DOS SANTOS *et al.*, 2000). O volume de veneno produzido varia entre as espécies. Por exemplo, um animal adulto da espécie *Loxosceles reclusa*, libera em média 4µl de veneno no momento da picada. Este volume de veneno pode conter aproximadamente de 60 a 100 µg de proteína (SAMS *et al.*, 2001). Estudos mostram que os venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* correspondem a uma mistura de proteínas que apresentam perfil eletroforético similar, no qual existe predominância de proteínas de baixa massa molecular. Assim, para melhor descrever a composição do veneno, podemos separar esse perfil eletroforético em 4 grupos de proteínas: (a) um grupo de proteínas com baixa massa molecular, que se encontra no intervalo de 5-10 kDa, do qual fazem parte os peptídeos neurotóxicos, (b) outro grupo de proteínas com massa molecular encontradas no intervalo de 30-40 kDa, constituído principalmente pelas dermonecroticas, (c) um terceiro grupo, com amplo espectro de massa molecular, no qual se encontram as metaloproteases e, por último (d) um grupo de proteínas com alta massa molecular, no intervalo de 60-95 kDa, do qual fazem parte as serino-proteases (da SILVEIRA *et al.*, 2002; da SILVA *et al.*, 2004; SILVESTRE *et al.*, 2005).

Além de proteínas, na composição do veneno são encontrados íons, sais minerais, aminoácidos livres, amins, poliaminas neurotóxicas e neurotransmissores (ESCOUBAS *et al.*, 2000). Estudos de identificação e caracterização das toxinas presentes nos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* revelaram a presença de metaloproteases, fosfolipases-D, hialuronidase, serino-proteases, além de lipase, esterase, fosfatase alcalina e 5'-ribonucleotídio-fosfohidrolase (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; da SILVA *et al.*, 2004; PETERSON, 2006, da SILVA 2007a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Dos componentes citados acima, as fosfolipases-D são as toxinas que se encontram melhor caracterizadas bioquimicamente e cuja atividade biológica se encontra melhor estabelecida (ANDRADE *et al.*, 2005). A massa molecular média das fosfolipases-D é de 30 a 33 kDa. Já foram caracterizadas várias isoformas de fosfolipase-D nos venenos loxoscélicos; esta família de toxinas apresenta um alto nível de identidade e tem sido

chamada de Loxtox por alguns autores (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). A família das fosfolipases-D é também conhecida como família das dermonecróticas, por serem as principais responsáveis pela dermonecrose (fator dermonecrótico) (CARDOSO *et al.*, 2003). Elas apresentam atividade esfingomielinásica, podem promover agregação plaquetária, hemólise, letalidade, nefrotoxicidade e hiperpermeabilidade vascular. (TAMBOURGI *et al.*, 1998; da SILVA *et al.*, 2004; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; RATTMANN *et al.*, 2008).

Atualmente, foram identificadas pelo menos 11 isoformas de fosfolipases-D no veneno de *L. gaucho* (CUNHA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005). O nosso grupo já possui clonadas seis isoformas de fosfolipases-D de *L. intermedia*. Estas toxinas foram clonadas a partir da construção de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* e identificadas através do sequenciamento aleatório dos clones obtidos nessa biblioteca. As proteínas foram caracterizadas e, posteriormente, algumas destas isoformas de fosfolipases-D foram expressas como toxinas recombinantes em *E. coli* e purificadas para caracterização bioquímica e avaliação biológica. Desta maneira, já foram estudadas e caracterizadas as toxinas recombinantes LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006), LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA *et al.*, 2006), LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA *et al.*, 2007a) e LiRecDT6 (APELL *et al.*, 2007). A isoforma LiRecDT1 é a mais abundante na glândula de veneno de *L. intermedia* e foi subclonada em vetor de expressão pET-14b. As proteínas recombinantes foram avaliadas por *western blotting*, sendo especificamente reconhecidas por soro hiperimune de coelho anti-veneno bruto de *L. intermedia* (DA SILVEIRA *et al.*, 2006). Recentemente, foi realizada uma mutação sítio dirigida na enzima LiRecDT1, que resultou na substituição da histidina presente no sítio ativo catalítico por uma alanina, originando a isoforma LiRecDT1 H12A. Esta toxina mutada apresentou uma redução drástica da atividade esfingomielinásica e uma capacidade muito reduzida em causar dermonecrose em pele de coelhos (CHAIM *et al.*, 2008).

No veneno da aranha marrom, além das toxinas dermonecróticas, um outro grupo de destaque é o das proteases. Duas metaloproteases de baixa massa molecular foram identificadas no veneno de *L. intermedia*, denominadas Loxolisina A e Loxolisina B. A primeira, com massa molecular de 20-28 kDa, apresenta atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica, enquanto, a segunda, com massa molecular de 32-35 kDa, apresenta atividade gelatinolítica. A atividade biológica dessas metaloproteases está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos, hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos, interferência na adesão plaquetária e, também, na dificuldade de cicatrização das lesões

cutâneas (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; ZANETTI, *et al.*, 2002). Atualmente, com o auxílio das técnicas de clonagem molecular algumas metaloproteases identificadas na glândula produtora de veneno de *L. intermedia* foram classificadas como membros da família das astacinas. As astacinas, juntamente com outras famílias de endopeptidases ligantes de zinco, como as matrilisinas (MMPs, colagenases), serralisinas (proteases bacterianas) e adamalisinases (proteases de venenos de cobra), podem ser classificadas como pertencentes a uma superfamília de metaloproteases chamada de Metzincinas. As principais características dos membros dessa superfamília: são uma seqüência consenso de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH) e um “Met-turn” na cadeia polipeptídica, promovido por um resíduo de metionina. (STOCKER *et al.*, 1995; Da SILVEIRA *et al.*, 2007c; SENFF–RIBEIRO *et al.*, 2008). Esta metaloprotease do tipo astacina foi produzida como toxina recombinante e caracterizada por nosso grupo, sendo denominada LALP (*Loxosceles* Astacin-Like Protease) (Da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

No veneno de aranha marrom foram identificadas, também, duas serino-proteases, com massa molecular de 85 e 95 kDa. Ambas demonstraram especificidade de substrato, sendo capazes de degradar a gelatina e muito fracamente a caseína (VEIGA *et al.*, 2000b).

A presença de hialuronidases também foi determinada, através da degradação de ácido hialurônico (HA) e resíduos de condroitin-sulfato proteoglicano (CS). Essas hialuronidases são hidrolases do tipo endo- β -N-acetil-D-hexosaminidase, que geram resíduo terminal N-acetilglucosamina após a clivagem do HA. Sua provável contribuição no quadro dermonecrotico consiste na extensão das lesões dermonecroticas e no espalhamento gravitacional (DA SILVA *et al.*, 2004; Da SILVEIRA *et al.*, 2007b). O efeito tóxico do veneno se deve à atividade em conjunto dos diferentes constituintes, ou seja, um efeito tóxico sinérgico (GEREN *et al.*, 1976).

Estudos de identificação, caracterização bioquímica e do efeito biológico das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* têm sido intensamente realizados. Entretanto, as atividades biológicas destas e de outras toxinas ainda não descritas, com possível aplicação biotecnológica, necessitam ser identificadas e melhor caracterizadas bioquimicamente. A clonagem e a expressão de proteínas heterólogas com o advento da tecnologia do DNA recombinante e as ferramentas de estudo proporcionadas pela Biologia Molecular têm auxiliado na caracterização bioquímica dos venenos de *Loxosceles*, bem como de seus efeitos biológicos, proporcionando conhecimento científico de aplicação

biotecnológica direta, o desenvolvimento de drogas farmacêuticas e de modelos de obtenção de fármacos para o tratamento dos eventos patológicos associados à picada das aranhas do gênero *Loxosceles*.

1.5 Fosfolipases-D (PLD)

A ação completa do veneno loxoscélico pode ser melhor compreendida quando se avalia a ação de sua principal toxina: uma fosfolipase-D. Inicialmente, esta toxina foi denominada esfingomielinase-D (SMase-D), porém, como essa enzima demonstrou ser capaz de hidrolisar amplo espectro de fosfolipídios esse termo tornou-se muito limitado para descrevê-la (LEE e LYNCH, 2005). A atividade de fosfolipase-D nos diferentes venenos de espécies de *Loxosceles* estudados corresponde a enzimas de massa molecular muito próximas entre si, e têm sido consideradas como isoformas de uma mesma enzima (TAVARES, 2007). A presença de várias isoformas reflete um processo evolucionário comum encontrado no veneno da glândula das aranhas (CARDOSO *et al.*, 2003) e este é o caso da *Loxosceles intermedia*. Várias isoformas possuem função biológica específica (como dermonecrose e/ou atividade esfingomielinásica) e essas características parecem ser úteis contra uma variedade de presas.

KALAPOTHAKIS e colaboradores (2007) isolaram seqüências de cDNA codificantes para toxinas dermonecróticas e nomearam esse conjunto de enzimas como uma família, chamada de Loxtox. Baseado nas seqüências aminoacídicas, reuniram 6 grupos distintos dentro dessa família de toxinas. Ainda nesse estudo, verificaram que esses níveis de identidade eram significativos, estando entre 55% e 99%. Isso reflete, em particular, a conservação dos resíduos de aminoácidos 51-54 no *loop B* catalítico (domínio PCDC/S), 191-196 no *loop F* (domínio S/GDGITN) e 272-275 (domínio D/ENPW) presentes na região C-terminal. Além disso, existe também conservação do sítio catalítico, como os resíduos de aminoácidos H12, E32, D34, H48, D92 e K94 (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

Quanto à atividade enzimática, essas enzimas realizam a hidrólise da esfingomielinina, com a formação de ceramida-1-fosfato (C1P) e colina, subprodutos envolvidos em importantes fenômenos biológicos (MARCHESINI e HANNUN, 2004). Recentemente, LEE e LYNCH (2005) mostraram que uma enzima de 34 kDa, clonada a partir da glândula produtora de veneno de *L. reclusa*, foi capaz de hidrolisar não somente a esfingomielinina, mas um amplo espectro de fosfolipídios, como por exemplo,

lisofosfolipídios, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico cíclico. De acordo com esses dados, VAN MEETEREN e colaboradores (2004), utilizando uma toxina recombinante presente no veneno de *L. laeta* e caracterizada anteriormente como uma SMase-D, mostraram que a toxina apresentava atividade de hidrólise sobre a lisofosfatidilcolina (LPC), gerando ácido lisofosfatídico (LPA). Esse fosfolipídio é atualmente reconhecido como mediador lipídico pleiotrópico, que atua diretamente sobre determinados receptores relacionados com a sinalização intracelular via proteína G, e que são encontrados em diferentes tipos celulares (MOOLENAAR, 1999; LEE e LYNCH, 2005). Assim, através da geração do LPA a fosfolipase-D poderia estar envolvida com fenômenos relacionados à agregação plaquetária, hiperpermeabilidade vascular e com a resposta inflamatória (HASERUCK *et al.*, 2004).

MURAKAMI e colaboradores (2006) reportaram estudos estruturais, através de cristalografia por difração de raios-X, de uma isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. laeta*. Descreveram, também, o mecanismo catalítico de hidrólise da esfingomielina resultando na formação de (C1P) e colina, via íon dependente (Mg^{2+}), em um mecanismo ácido-base envolvendo duas histidinas presentes no sítio catalítico da enzima (His12 e His47). Na Figura 6, pode-se observar o *loop* catalítico (resíduos 46-60), que contem o importante resíduo H47 e o *Hairpin* na presença de uma ponte dissulfeto (Cys51 – Cys57). Neste mesmo estudo foi sugerida a participação do íon Mg^{2+} , presente no sítio catalítico, na coordenação e estabilização do “fosfonato” da esfingomielina durante a hidrólise. O íon Mg^{2+} é coordenado tetraedricamente por três resíduos de aminoácidos (Glu32, Asp34 e Asp91) e uma molécula de água.

Há indicações que a His47 comporta-se como o nucleófilo, a qual inicia o processo de hidrólise, pois ataca a ligação fosfodiéster do substrato. Já a His12 doa um átomo de hidrogênio para o intermediário penta-coordenado, o que resulta na formação da colina. Presumidamente, a His12 desprotonada é hábil para retirar um próton da molécula de água, iniciando um segundo ataque nucleófilo sobre o intermediário de reação, que dessa vez, resulta na formação e liberação da ceramida-1-fosfato, como ilustrado na Figura 7.

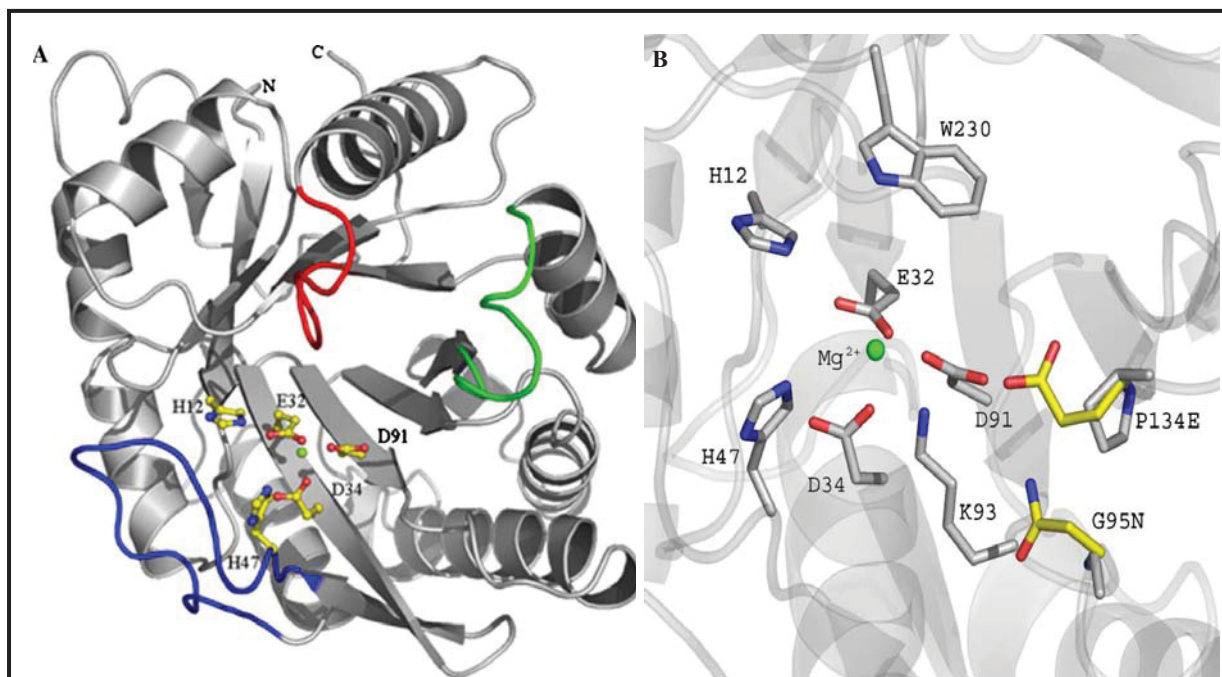


Figura 6: Representação em fita da Fosfolipase-D de *Loxosceles laeta*. (A) O Loop catalítico, flexível e variável coloridos de azul, vermelho e verde respectivamente. (B) Vista do sítio catalítico, o Mg^{2+} representado em verde e os três resíduos de aminoácidos Glu32, Asp34 e Asp91, que participam da coordenação do íon. Adaptado de MURAKAMI *et al*, 2006.

ANDRADE e colaboradores (2006) descreveram uma análise estrutural comparativa entre a SMase de *L. laeta*, SMase1 e SMase2 de *L. intermedia* (ambas isoformas recombinantes de fosfolipase-D). Nessa análise observou-se que os aminoácidos envolvidos na catálise e no sítio de ligação ao íon metálico são estritamente conservados. Uma diferença encontrada entre elas é uma ponte dissulfeto adicional nas toxinas de *L. intermedia*. Foi demonstrado, também, que a SMase1 hidrolisa esfingomiéline com menor eficiência que a SMase2. Essa menor atividade esfingomiélinásica foi atribuída à substituição de um aminoácido na posição 203 (Pro→Leu), que alterou a hidrofobicidade do canal, que poderia desempenhar um papel no reconhecimento do substrato. Assim, pequenas modificações estruturais, tais como substituições sobre a superfície dos *loops*, podem afetar a atividade enzimática. Isso sugere, que além do sítio ativo das PLDs, existem outras regiões estruturais que participam no reconhecimento e ligação ao substrato.

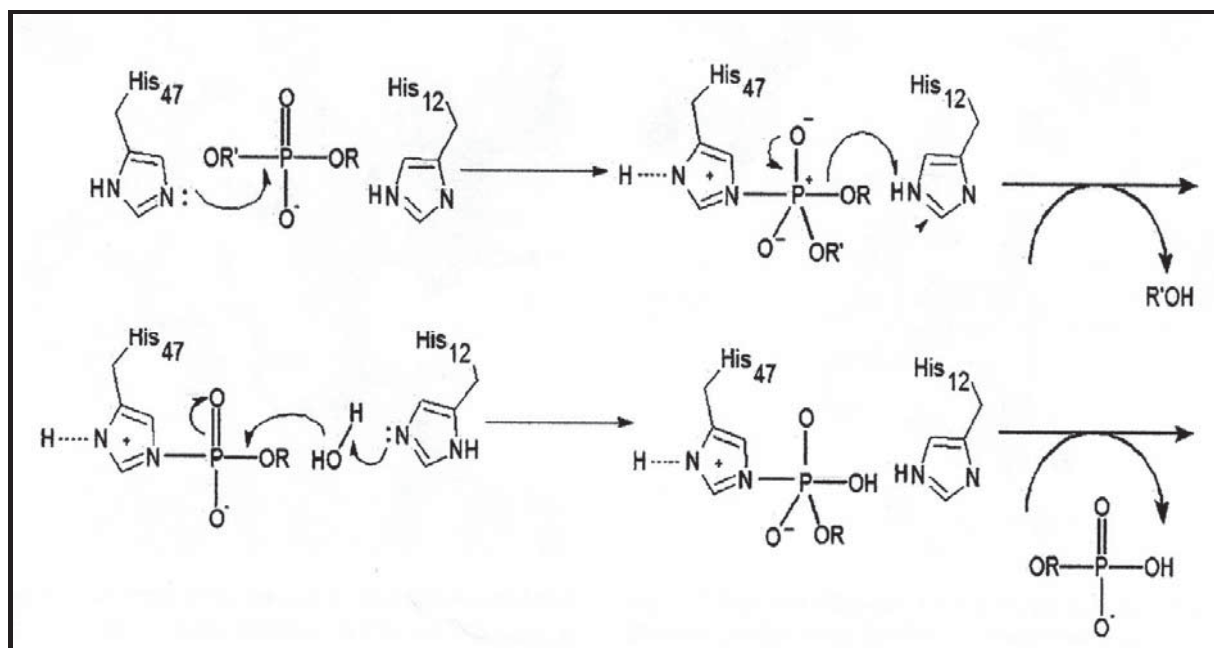


Figura 7: Mecanismo catalítico da fosfolipase-D. A hidrólise da esfingomielina resulta na formação de (C1P) e colina, via íon dependente (Mg^{2+}), em um mecanismo ácido-base envolvendo duas histidinas (His12 e His47) presentes no sítio catalítico da enzima. Modificado de MURAKAMI *et al.*, 2006.

A principal importância da atividade catalítica dessas fosfolipases-D se deve ao metabolismo da esfingomielina, considerando que a ação dessas toxinas é decisiva na patogênese decorrente do acidente com aranha marrom. Acredita-se que os metabólitos da esfingomielina possam modular uma variedade de eventos biológicos, que englobam desde a proliferação e diferenciação celular até fenômenos de apoptose (MARCHESINI e HANNUN, 2004); (TANI, ITO e IGARASHI, 2007). A ceramida-1-fosfato é uma molécula lipídica bioativa capaz de estimular a proliferação celular por aumento da síntese de DNA, inibir esfingomielinase ácida, bloquear a síntese de ceramida e ativar diretamente a fosfolipase- A_2 induzindo a produção de eicosanóides (LEE e LYNCH, 2005); (PETERSON, 2006).

1.6. O Eritrócito

O eritrócito humano maduro é uma célula “simples”, com vida útil de aproximadamente 120 dias na circulação periférica e caracteriza-se por apresentar flexibilidade fisiológica notável. Sua função essencial é transportar oxigênio para os tecidos

através das moléculas hemoglobina. É caracterizado por acentuadas particularidades metabólicas e estruturais. Os eritrócitos maduros têm sua origem em células progenitoras da medula óssea e durante o processo de diferenciação, ocorre a perda, por exocitose, do núcleo e outras organelas, como retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos (BRATOSIN *et al.*, 2001); (SPRAGUE, STEPHENSON e ELLSWORTH, 2007). Dessa forma, o eritrócito maduro é incapaz de sintetizar proteínas e não possui metabolismo aeróbico (NAOUM, 1997).

A homeostase do íon Cálcio (Ca^{2+}) é outra propriedade importante dos eritrócitos e esta depende, predominantemente, do equilíbrio entre a baixa permeabilidade passiva da membrana plasmática ao íon e uma bomba Ca^{2+} /ATPase altamente ativa presente na membrana dos eritrócitos (KUCHERENK e BERNHARDT, 2006). A concentração intracelular de (Ca^{2+}) é mantida em nível baixo, cerca de 100 nM. Muitos fatores alteram a função da bomba Ca^{2+} /ATPase e por conseguinte a sua concentração intracelular. Esses fatores podem atuar por influenciar a composição protéica, a localização e redistribuição dos lipídios da membrana eritrocitária (KUCHERENK e BERNHARDT, 2006).

O eritrócito é um excelente modelo experimental devido à facilidade com que pode ser obtido e apresentar fácil preservação. Além disso, há grande interesse científico pelos processos fisiopatológicos que nele ocorrem. Apesar de sua aparência simples, esta “bolsa de hemoglobina” tem um papel importante na sua própria distribuição, permitindo o fornecimento de oxigênio para atender precisamente e localizada a necessidade metabólica do organismo (SPRAGUE, STEPHENSON e ELLSWORTH, 2007).

A membrana plasmática tem papel chave na manutenção da forma do eritrócito, sendo constituída por 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. Entre os lipídios, o colesterol e os fosfolipídios estão organizados na bicamada em quantidades quase equimolares (HARRIS, 1991). Os tipos predominantes de fosfolipídios presentes na face interna da membrana são a fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilserina (PS) e a fosfatidilcolina (PC) e a esfingomiélnina (SM) mais abundantes na face externa da membrana (JAIN, 1985). A fosfatidilserina da membrana do eritrócito possui funções biológicas importantes, como: co-fator pró-coagulante e sinal de morte celular (ZWAAL, 1978).

Vários tipos de injúria eritrocitária estimulam a formação de prostaglandina- E_2 através da ativação da ciclooxigenase (COX-2) do eritrócito, levando a ativação do canal permeável ao Ca^{2+} (LANG *et al.*, 2005a). O aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol ativa os canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} , chamados canais de Gardos, levando a

hiperpolarização, subseqüentemente perda de KCl e redução do volume do eritrócito. A *scramblase*, que é a enzima responsável pela externalização de fosfatidilserina (“Flipase” de “Flip Flop”) é estimulada não somente pelos efeitos do Ca^{2+} , mas também pela ceramida formada pela ação da esfingomielinase. A entrada de Ca^{2+} ou a formação de ceramida são capazes de ativar a *scramblase* promovendo a externalização de fosfatidilserina da face interna para a externa da membrana (LANG *et al.*, 2004; LANG *et al.*, 2005a; LANG *et al.*, 2005b).

A fosfatidilserina na superfície do eritrócito é reconhecida por macrófagos, por meio de receptores específicos e são retiradas da circulação por fagocitose. Esse é um mecanismo para evitar a ruptura de eritrócitos e a conseqüente liberação de hemoglobina, a qual, ao passar pelo glomérulo renal precipita nos túbulos e causa obliteração dos mesmos, resultando em falência renal. Alguns aspectos de morte por apoptose de células nucleadas como, redução de volume, exovesiculação de membrana e exposição de fosfatidilserina também ocorre nos eritrócitos, devido a isso alguns autores referem-se a esse mecanismo como “*Eriptose*” (LANG *et al.*, 2005ab). Via de sinalização para morte e retirada dos eritrócitos de circulação.

Muitos autores mostraram que eritrócitos de algumas espécies de mamíferos possuem composição fosfolipídica característica, por exemplo, na porcentagem de esfingomielina e de fosfatidilcolina na membrana (OCHI *et al.*, 2004). Na Tabela 4 estão listados alguns animais e suas respectivas porcentagens de fosfolipídios na membrana do eritrócito.

A composição lipídica da membrana dos eritrócitos de mamíferos é diferente em relação à porcentagem de esfingomielina, sendo parcialmente substituída por fosfatidilcolina de acordo com a espécie (IVANOV, 2007). Acredita-se que a esfingomielina é o fosfolipídio mais hidrofóbico, conferindo maior estabilidade à bicamada lipídica e às proteínas associadas (aumento da hidrofobicidade). Sabe-se, também, que a quantidade de esfingomielina está relacionada com a estabilidade térmica do eritrócito, sendo a porcentagem de esfingomielina diretamente proporcional a resistência à lise pelo calor (IVANOV, 2007). Esse mesmo autor sugere que a porcentagem de esfingomielina está diretamente relacionada com o tempo de vida do eritrócito e a permeabilidade da membrana a íons (IVANOV, 2007).

Origem do Eritrócito	Porcentagem de esfingomielina	Porcentagem de fosfatidilcolina	Modificado a partir de:
<i>Carneiro</i>	50%	*	OCHI <i>et al.</i> , 2004.
<i>Coelho</i>	20%	~ 34%	OCHI <i>et al.</i> , 2003.
<i>Humano</i>	~ 19%	~ 35%	INGRAHAM <i>et al.</i> , 1981.
<i>Cavalo</i>	~ 14%	~ 42%	OCHI <i>et al.</i> , 2003.
<i>Camundongo</i>	~ 9.2%	~ 43,5%	INGRAHAM <i>et al.</i> , 1981.
<i>Rato</i>	~ 8,7%	~ 47,5%	JAIN, 1985.

*Não detectado.

Tabela 4: Composição fosfolipídica de eritrócitos de alguns mamíferos.

Por outro lado, o controle da morfologia eritrocitária depende de fatores como a interação entre o citoesqueleto e a bicamada lipídica, da disponibilidade energética e de agentes externos (LANGE e SLAYTON, 1982). Modificações na forma normal do eritrócito (discócito) podem indicar a diminuição da eficiência metabólica ou a ação de certos compostos, resultando em alterações na tensão existente entre o gel protéico do citoesqueleto e a bicamada lipídica (BEUTLER *et al.*, 1995). Quando ocorre uma expansão da porção externa da bicamada lipídica, o resultado é a formação do equinócito. A expansão da porção interna, por sua vez, forma o estomatócito. Tais formas são reversíveis e interconvertíveis (CHAILLEY *et al.*, 1973). Entretanto, no caso do aumento da viscosidade, rigidez e perda de porções da membrana essas formas tornam-se danificadas irreversivelmente e altamente suscetíveis à hemólise, sendo chamadas de esferócito (SIMMONS, 1997), como ilustrado na Figura 8.

A diminuição da razão entre esfingomielina e fosfatidilcolina promove modificações estruturais na membrana eritrocitária (IVANOV; TOLEKOVA e CHAKAAROVA, 2007). Essas modificações estruturais podem ocorrer também em microdomínios lipídicos, chamados de *lipid rafts*, que são pequenas regiões da membrana plasmática enriquecidas em esfingolipídios e colesterol (NASLAVSKY *et al.*, 1999; BARON *et al.*, 2002). Esses microdomínios lipídicos na membrana são formados graças à condensação de esfingolipídios saturados com colesterol, gerando uma camada lipídica

organizada que acumula proteínas ancoradas por GPI e exclui a maioria das proteínas transmembranas (SIMONS e IKONEN, 1997).

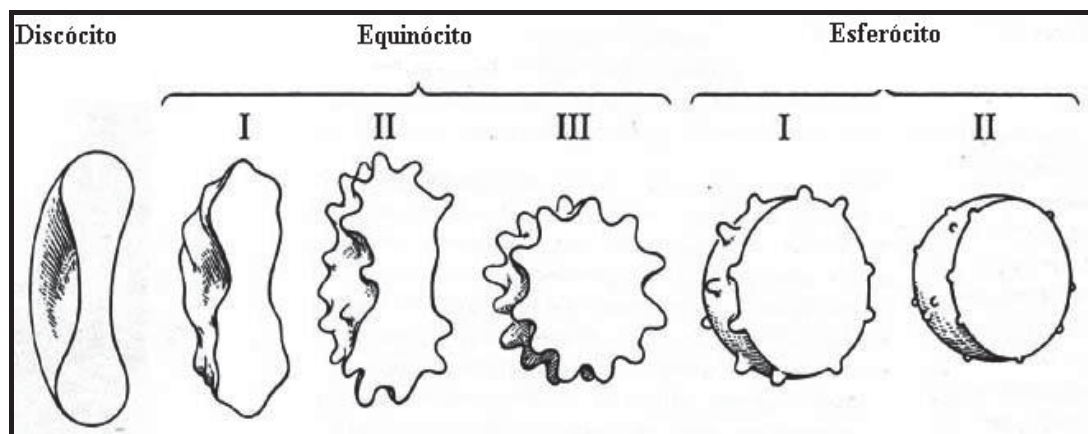


Figura 8: Seqüência de alterações morfológicas dos eritrócitos. Modificado a partir de STELLO *et al.*, 2003.

Atualmente acredita-se que os esfingolípídios são componentes importantes da membrana plasmática eucariótica, pois, estes compostos têm numerosas funções, tais como a regulação da transdução nas vias de sinalização intracelular, direcionando proteínas, mediando interações e reconhecimento célula-célula (TANI, ITO e IGARASHI, 2007). Os metabólitos da esfingomielina, incluindo ceramida (N-acilesfingosina, Cer), esfingosina (Sph) e esfingosina-1-fosfato (S1P), surgiram como uma nova classe de lipídeos biomoduladores de diversas funções celulares, apresentando funções, também, no espaço extracelular, incluindo a face externa da membrana plasmática. A S1P é um exemplo, considerada com função não apenas intracelular, mas também como um mensageiro extracelular na regulação da morfologia e mobilidade das células.

A degradação da esfingomielina (SM) é a principal via envolvida na produção desses mensageiros lipídicos (HANEL, ANDRÉANI, e GRALER, 2007). Os representantes melhor caracterizados desse tipo de sinalização é o ácido lisofosfatídico (LPA) e a esfingosina-1-fosfato (S1P) (ANLIKER e CHUN, 2004), representados na Figura 9.

Segundo CHALFANT e SPIEGEL (2005), existe a conversão dos metabólitos da esfingomielina como, por exemplo, a conversão da ceramida à esfingosina e à S1P. De acordo com isso, o estudo realizado por OCHI e colaboradores (2004), observaram

evidências de que a α -toxina de *Clostridium perfringens* induz hemólise de eritrócitos de carneiro, através da ativação do metabolismo da esfingomielina, especialmente pela formação de S1P.

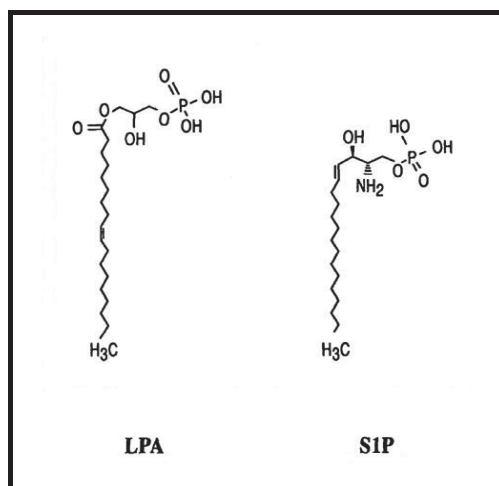


Figura 9: Estrutura química dos lisofosfolípidios sinalizadores LPA e S1P. Adaptado de ANLIKER e CHUN, 2004. *LPA: (1-oleoyl) lysophosphatidic acid; S1P: sphingosine-1-phosphate.

Há evidências da presença de quatro receptores de superfície de alta afinidade por LPA, descritos em mamíferos, e também de cinco receptores celulares para fosfolípidios associados à proteína G (GPCRs) cognatos para S1P. Os GPCRs foram renomeados pela IUPHAR como LPA₁, LPA₂, LPA₃ e LPA₄ para o ácido lisofosfatídico, e como S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ e S1P₅ para a esfingosina-1-fosfato. Muitos efeitos dos *liso*esfingolipídios se devem ao acoplamento dos seus receptores às proteínas G que, por sua vez, regulam a atividade de outros mensageiros intracelulares (ANLIKER e CHUN, 2004), como ilustrado na Figura 10.

Existem estudos sobre o modelo de membranas mimetizando a composição lipídica da membrana eritrocitária e análises de porções da membrana detergente-resistente indicando que os microdomínios lipídicos estão presentes nos eritrócitos. E proteínas ancoradas por “glicosilfosfatidilinositol” (GPI) como a acetilcolinesterase, CD55, CD59 e as proteínas oligoméricas como a estomatina, flotillina-1 e flotillina-2, são as principais proteínas integrantes desses microdomínios (SALZER, HUNGER e PROHASKA, 2008). Foi mostrado, também, que componentes do citoesqueleto, como espectrina e actina, são fortemente ligados aos microdomínios de membranas, sugerindo um papel para o

citoesqueleto na regulação de *lipid rafts*, presumivelmente por influenciar a sua mobilidade e tamanho (SALZER, MAIRHOFER e PROHASKA, 2007). Nos eritrócitos, os *lipid rafts* parecem estar envolvidos em processos de exovesiculação e localização de proteínas específicas que estão concentradas nas protusões eritrocitárias, como por exemplo, nas pontas do equinócito (SALZER, HUNGER e PROHASKA, 2008). A composição da membrana nas protusões indica uma segregação dos diferentes tipos de *lipid rafts* durante o processo de exovesiculação. Nesses processos, a AChE e a CD55 estão mais concentradas nessas regiões do que a estomatina e que as flotilinas (SALZER *et al.*, 2002; MINETTI *et al.*, 2003). Foi demonstrado também que várias proteínas relacionadas às vias de transdução de sinal se encontram em *lipid rafts* na membrana eritrocitária, na forma de plataformas de sinalização, de uma maneira dependente da presença de colesterol (FOSTER *et al.*, 2003); (SALZER, MAIRHOFER e PROHASKA, 2007).

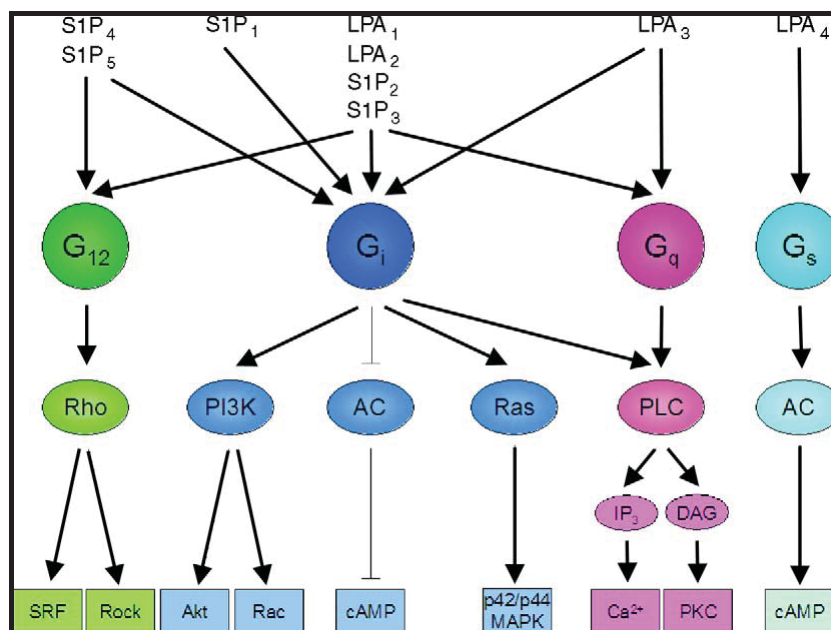


Figura 10: Via geral de sinalização por LPA e S1P. Interação do LPA e S1P com receptores associados à proteína G e subsequente produção de segundos mensageiros e moléculas efetoras. Adaptado de ANLIKER e CHUN, 2004.

*AC, adenyl cyclase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; DAG, diacylglycerol; p42/p44 MAPK, p42/p44 mitogen-activated protein kinase; IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; Rock, Rho associated kinase; SRF, serum response factor.

1.7 A Atividade hemolítica do veneno

Como discutido anteriormente, os estudos investigando a atividade hemolítica do veneno da *L. reclusa* produziram resultados conflitantes. Um estudo utilizou extrato do cefalotórax da aranha marrom e demonstrou que este material provoca hemólise direta dos eritrócitos humanos (DENNY, DILLAHA e MORGAN, 1964). Porém, os extratos de cefalotórax contêm material do tubo digestivo, além do material das glândulas produtoras de veneno. Em 1966, num relato de caso, TAYLOR e DENNY (1966) descreveram a evolução clínica e morte de um homem que se presume ter sido picado por *Loxosceles reclusa* e que desenvolveu hemólise e insuficiência renal. SMITH e MICKS (1968) não foram capazes de obter qualquer atividade hemolítica com os venenos de *L. laeta*, *L. reclusa*, ou *L. rufescens*. Porém, os extratos abdominais causaram hemólise *in vitro* de eritrócitos humanos. MORGAN e colaboradores (1978) relataram hemólise *in vitro* de eritrócitos humanos quando o veneno de *L. reclusa* foi adicionado ao plasma (que contêm as moléculas do sistema complemento). CHU e colaboradores (1978) descreveram o caso de um menino de 2 anos, que foi picado no tórax e desenvolveu um quadro grave de anemia hemolítica. Este paciente, contudo, não desenvolveu uma lesão dermonecrótica correspondente. No ano seguinte, FUTRELL e colaboradores (1979) revelaram que um componente ativo do veneno de *L. reclusa* era capaz de se ligar à membrana eritrocitária humana na ausência de soro. Fortes evidências da atividade lítica do veneno de *L. reclusa* sobre eritrócitos humanos foram relatadas por FORRESTER e colaboradores (1978). Esses pesquisadores mostraram que eritrócitos de carneiro foram mais susceptíveis ao veneno da *L. reclusa*, do que os eritrócitos humanos, embora ambas as espécies exibissem apreciável lise. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que eritrócitos de carneiro tratados com veneno e, posteriormente, purificados apresentavam degradação da esfingomielina (FORRESTER *et al.*, 1978).

TAMBOURGI e colaboradores (2000) verificaram que uma proteína de 35 kDa, purificada a partir do veneno total da *L. intermedia*, atua sobre a superfície de eritrócitos humanos promovendo a ativação o sistema complemento, tanto pela via clássica quanto pela via alternativa, provocando hemólise complemento dependente. Acredita-se que a via clássica do sistema complemento seja ativada através da perda da assimetria da membrana eritrocitária, resultante da externalização de fosfatidilserina. A fosfatidilserina tem sido reportada como capaz de ativar o sistema complemento e, com isso, levar à formação do complexo de ataque à membrana (CAM), resultando em hemólise (TAMBOURGI *et al.*,

2002). Finalmente, quando eritrócitos foram tratados com a fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* e incubados com soro humano C8-depurado (molécula que estabiliza a formação do complexo de ataque à membrana), observou-se aumento de C1q, uma proteína da via clássica do sistema complemento, que possui a capacidade de ligar anticorpo e promover a ativação do sistema complemento (TAMBOURGI *et al.*, 2007). Acredita-se, também, que outro possível mecanismo de indução da hemólise complemento dependente seria a ativação de uma metaloprotease endógena pela fosfolipase-D presente no veneno da aranha marrom. Essa metaloprotease endógena clivaria as glicoforinas presentes na superfície dos eritrócitos, tornando-os susceptíveis a hemólise pelo complemento (TAMBOURGUI *et al.*, 2000).

Ensaio utilizando três toxinas dermonecróticas recombinantes, LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3, sendo que as duas primeiras apresentam maior identidade entre si, do que com a terceira, mostraram que estas toxinas foram capazes de evocar reações inflamatórias semelhantes em pele de coelho. Entretanto, a LiRecDT1 e a LiRecDT2 ocasionaram maior porcentagem de hemólise dependente de complemento, quando comparadas à LiRecDT3. Esta última induziu apenas um pequeno efeito hemolítico. Isso pode ser associado à atividade esfingomielinásica, já que as duas primeiras apresentam alta atividade catalítica e, a última, apenas uma atividade catalítica residual (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Considerando tudo que foi exposto sobre o quadro grave de loxoscelismo e avaliando as conseqüências desencadeadas pelos efeitos do veneno de aranhas marrom, como por exemplo, o afastamento do trabalho, os prejuízos à saúde dos acidentados, o risco de vida e as seqüelas deformantes que permanecem mesmo após a recuperação das vítimas, fica evidente a necessidade de uma melhor compreensão da atividade tóxica do veneno de *L. intermedia*, assim como de estudos detalhados dos mecanismos envolvidos na patogênese desses acidentes que propiciem novos métodos de diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar a atividade hemolítica de toxinas recombinantes dermonecróticas (Fosfolipases-D) obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* e avaliar a relação com atividade catalítica dessas toxinas, assim como investigar os possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade hemolítica direta do veneno de *L. intermedia* e das toxinas recombinantes (Fosfolipases-D) sobre eritrócitos humanos;
- ✓ Avaliar o efeito de agentes quelantes de íons divalentes e outros inibidores enzimáticos sobre a atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1;
- ✓ Analisar a influência dos sistemas ABO e Rh sobre a atividade hemolítica da toxina recombinante LiRecDT1;
- ✓ Avaliar os efeitos do veneno de *L. intermedia* e das toxinas recombinantes sobre eritrócitos de diferentes animais;
- ✓ Observar os efeitos do veneno de *L. intermedia* e das toxinas recombinantes sobre a morfologia de eritrócitos humanos;
- ✓ Observar a capacidade do veneno de *L. intermedia* e das toxinas recombinantes em alterar o tamanho dos eritrócitos humanos;
- ✓ Detectar se há ligação ou interação das toxinas recombinantes, bem como do veneno de *L. intermedia*, com eritrócitos *in vitro*;

- ✓ Verificar se o veneno de *L. intermedia* e as toxinas recombinantes promovem alterações no perfil de distribuição dos microdomínios lipídicos da membrana eritrocitária;
- ✓ Averiguar se o veneno de *L. intermedia* e as toxinas recombinantes são capazes de alterar a assimetria da membrana eritrocitária, por exposição de fosfatidilserina.
- ✓ Investigar a participação da atividade catalítica da Fosfolipase-D na atividade hemolítica, utilizando uma toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

Os sais utilizados foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e as soluções preparadas para o uso nos eritrócitos tiveram pH (PHS-3B, Labmeter) e osmolaridade (“VAPRO 5520”, Wescor, Utah, EUA) ajustados. A triptona e extrato de levedura utilizados foram provenientes da HiMedia (Mumbai, Índia). A ampicilina foi adquirida da USB (Cleveland, OH, EUA). O IPTG, a Anexina V marcada com FITC e a Toxina Colérica marcada com Alexa Flúor 594 foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O Soro Fetal Bovino foi adquirido da Cultilab (Campinas, Brasil) e o Tris Base adquirido da Gibco BRL (Bethesda, EUA). A Albumina de Soro Bovino (BSA), o ágar-ágar, o anti-IgG de coelho marcado com FITC, o Hepes, a Sucrose e a D-Glucose foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). As placas (24 e 96 poços - Polysorp[®] e Maxysorp[®]) foram compradas da Nalge Nunc International Corporation (Naperville, IL, EUA).

3.1.2 Animais

Os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care). Os certificados de liberação para realização dos experimentos utilizando animais e humanos emitidos pelos respectivos Comitês de Ética em Experimentação (CEEA E CEP-BIOLÓGICAS “UFPR”) estão anexados ao final dessa dissertação. Neste trabalho, foram utilizados indivíduos adultos de *Loxosceles intermedia* coletados na cidade de Curitiba e região Metropolitana e de exemplares fornecidos pelo LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos) da UFPR. Os camundongos suíços, coelhos neozelandeses e cavalos foram utilizados para a obtenção de 1mL de sangue nos ensaios de hemólise “*in vitro*”. Os

coelhos neozelandeses também foram utilizados para a obtenção de soro hiperimune ao veneno de *Loxosceles intermedia*, assim como a toxina recombinante. Estes animais ficaram acomodados em condições de temperatura constante (21 ± 2 °C) e luminosidade controlada (12 horas de claridade e 12 horas de escuridão). Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Já dos cavalos saudáveis e de corrida, pertencentes ao Jockey Club do Paraná, Curitiba, foi apenas coletado sangue. O sangue de carneiro desfibrinado foi adquirido comercialmente da Newprov produtos para laboratório (Pinhais, PR, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque

O veneno de *Loxosceles intermedia* foi obtido de aranhas adultas em condições apropriadas e submetidas à eletrochoque de 15 volts no cefalotórax como descrito por FEITOSA *et al.*, 1998. Após a coleta, o veneno foi diluído em PBS e mantido à temperatura de -80 °C até o momento do uso.

3.2.2 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno total e nas toxinas recombinantes foi realizada através do método de Azul de Coomassie, como descrito por BRADFORD, 1976. A absorbância foi obtida em 610nm em leitor ELISA (Meridian, ELx 800, Auto Reader Diagnostics inc, EUA).

3.2.3 Obtenção de eritrócitos humanos

A coleta de amostras de sangue periférico foi feita por punção de voluntários adultos e saudáveis, de acordo com os requisitos definidos pelo Comitê de Ética em Experimentação em Humanos (CEP-Biológicas). Todo o material estéril utilizado foi adquirido comercialmente (Agulhas e Seringas BD Plastipak[®]). O anticoagulante utilizado foi EDTA Na₂ 5% adquirido da

Newprov produtos para laboratório (Pinhais, PR, Brasil), na proporção de 1 gota para cada mililitro de sangue.

3.2.4 Expressão de proteínas recombinantes a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia*

As toxinas utilizadas nesse trabalho foram obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno como descrito em CHAIM e colaboradores (2006); DA SILVEIRA e colaboradores (2006 e 2007a) e APPEL e colaboradores (2008). A seqüência do cDNA clonado está depositada no GenBank sob o número DQ218155 para LiRecDT1.

A toxina mutada foi obtida pelo método de PCR Megaprimer adaptado de SAMBROOK e RUSSELL (2001) por CHAIM e colaboradores (2008). Basicamente o procedimento foi realizado em três etapas de PCR, com o intuito de introduzir uma mutação sítio dirigida na seqüência original da toxina LiRecDT1; a toxina mutada resultante foi nomeada LiRecDT1 H12A. A primeira etapa de PCR incluiu a mutação do primeiro resíduo de histidina na posição 12 da seqüência nucleotídica utilizando o *primer forward* T7, o qual se anela a porção 5' do vetor pSPORT, e o *primer reverse* especialmente desenhado P1H12A. O esquema da Nota 1 ilustra a seqüência nucleotídica original da toxina LiRecDT1 e a modificação introduzida.

A proteína recombinante LiRecDT1-GFP foi obtida por subclonagem como a construção prévia da LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006). Nessa seqüência foi adicionada a seqüência da “green fluorescence protein” (EGFP) em pET-14b, usando-se a estratégia de *Blunt-Cut-Cut* em *NdeI* (pET-14b) e dois sítios *BamH I* (entre LiRecDT1, EGFP e o Vetor). O Resultado foi a construção de uma proteína de fusão com uma cauda “6x His-Tag” na região N-terminal, seguida da seqüência da LiRecDT1 madura e da EGFP na região C-terminal.

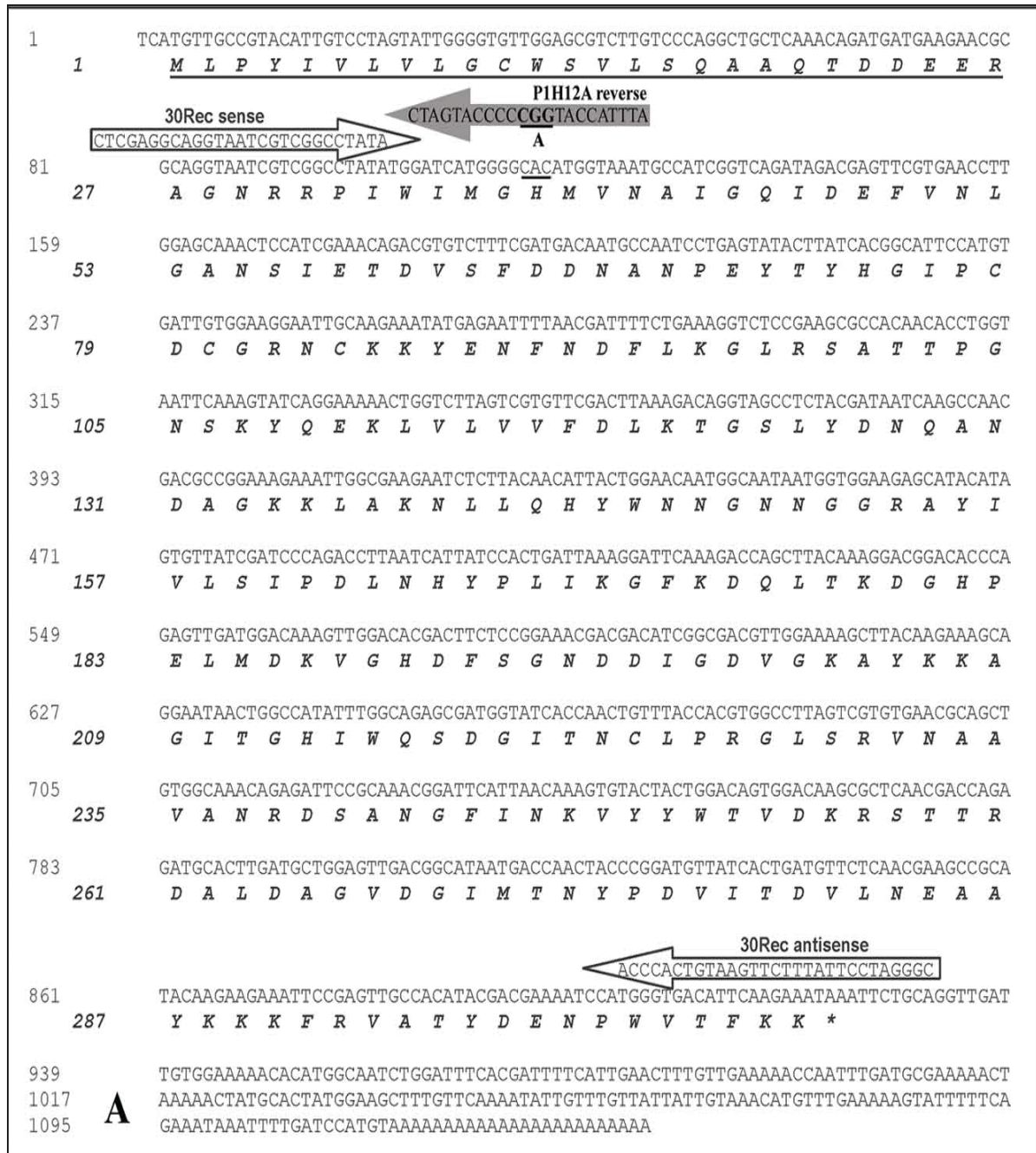
Em resumo, os cDNAs codificantes para as proteínas maduras foram amplificados por PCR utilizando *primers* desenhados para conter sítios de restrição na extremidade 5' para *Xho I forward* e *BamH I reverse*. O produto de PCR foi, então, digerido com tais enzimas e subclonado em pET-14b digerido com as mesmas enzimas. Em seguida, as construções foram expressas como proteínas de fusão em *E. coli* BL21(DE3)pLysS quimio-competentes contendo etiqueta de

histidinas (6x His Tag). Os clones obtidos tiveram suas seqüências confirmadas por sequenciamento de DNA.

Além disso, as colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas foram expandidas em 10 mL de meio líquido Luria Broth contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e posteriormente utilizadas para inocular volumes maiores de meio LB (1000 mL). Estas culturas, em larga escala, foram mantidas a 37°C com aeração constante, até D.O.₅₅₀ = 0,5. A indução da expressão das toxinas foi realizada pela adição de IPTG 0.05 mM e as culturas foram incubadas por um período de 3 h½ a 30 °C (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).

3.2.5 Purificação das proteínas LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LiRecDT1-GFP em resina Ni-NTA agarose

Após a indução da expressão das toxinas recombinantes em *E. coli* BL21(DE3)pLysS, as células foram sedimentadas por centrifugação e rompidas por criofratura com o auxílio de 40 mg de Lizosima (Sigma, St. Louis, MO, USA) em tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM), a quebra do DNA gênomico foi realizada mecanicamente. Após centrifugação adicional, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Ni-NTA agarose para a purificação da proteína recombinante de fusão, contendo a cauda de histidina (6x His Tag). A coluna foi lavada exaustivamente em tampão de lavagem (fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM) e eluída em tampão de eluição (fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM). As frações obtidas foram analisadas por SDS/PAGE 12,5%, reunidas e dialisadas contra PBS. As toxinas recombinantes purificadas foram dosadas pelo método de Bradford, aliquotadas e mantidas a -80°C até o momento do uso (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).



Nota 1: Sequência nucleotídica da toxina LiRecDT1 clonada a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* e a dedução da sua sequência aminoacídica. As setas brancas mostram a posição do anelamento com os primers (30 Rec sense) e (30 Rec antisense). A seta cinza ilustra o primer reverse, que inclui o códon da substituição na posição 12 na sequência de aminoácidos, originando a LiRecDT1 H12A (abaixo da linha, a Alanina na posição da Histidina) produzida por mutagênese pelo método do Megaprimer. *Corresponde ao Códon de parada.

3.2.6 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

As eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% em condições redutoras e não redutoras como descrito por LAEMMLI e colaboradores (1970). Para observação das proteínas, os géis foram corados com azul de Coomassie 0,02% em metanol 50%, ácido acético 10% em água deionizada. Os géis foram mantidos nesta solução por vinte minutos em temperatura ambiente, sob agitação constante e descorados com sucessivas trocas de metanol 50% com ácido acético 10% em água destilada (FAIRBANKS *et al.*, 1971). Finalmente, utilizaram-se marcadores de massa molecular para avaliar a altura das proteínas purificadas. Os marcadores utilizados foram ovoalbumina (44 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), β -lactoglobulina (20 kDa), lisozima (15 kDa), inibidor de tripsina (5,6 kDa) e insulina (3,0 kDa) adquiridos da BioRad (Hercules, CA, EUA).

3.2.7 Dose-resposta e tempo-dependência da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e veneno de *L. intermedia*

O ensaio hemolítico foi conduzido como descrito por HARRIS e PHOENIX, 1997. Essencialmente, 1 mL de sangue foi lavado três vezes em Tampão Tris/Sucrose (Sucrose 250 mM, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O) e centrifugados a 2000 *g por 3 minutos. Em seguida, foram ressuspensos no mesmo tampão para se obter uma concentração inicial de eritrócitos de aproximadamente 0.05%, correspondente a 5x10⁸ células/mL. Para se obter essa diluição, 250 μ l da suspensão de eritrócitos lavados foram diluídos em 6 ml de água destilada e a absorbância lida a 550nm. O resultado foi obtido utilizando-se a equação abaixo, com a finalidade de se determinar o volume para o qual a suspensão inicial deveria ser diluída para se obter a concentração desejada:

$$Volume\ final = \frac{Volume\ inicial \times A_{550nm}}{0,210}$$

O controle positivo constituiu-se de 100% de hemólise, a qual foi produzida com uma solução de 0.1% (v/v) Triton X-100 por 60 minutos à 37 °C. As alíquotas de 200 µL da suspensão de eritrócitos normalizada (perfazendo um total de 1×10^8 células) foram utilizadas conjuntamente com 200 µL da solução de tratamento. As soluções de tratamento foram compostas de várias concentrações de veneno e das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A separadamente (zero, 0.025, 0.25, 2.5 e 25µg/mL). As misturas resultantes foram incubadas a 37 °C na B.O.D, sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. Após os tempos de tratamento desejados (0, 4, 8, 16 e 24 horas), as suspensões foram centrifugadas por 3 minutos, a 2000 *g, a 4°C e a absorbância da hemoglobina livre no sobrenadante obtida em 550nm utilizando-se leitor ELISA. Em todos os casos, os níveis de hemólise foram determinados em porcentagem em relação ao controle positivo (Hemólise 100%). O Controle negativo foi obtido apenas com tampão e eritrócitos, em que não houve hemólise de fundo significativa.

3.2.8 Inibição da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1

Este ensaio foi realizado como descrito no item 3.2.7, porém 25µg/mL da toxina LiRecDT1 foram incubados com 1 mM EDTA (ligante forte de Magnésio), 1 mM EGTA (ligante forte de Cálcio), 1 mM 1,10-fenantrolina (ligante forte de Zinco) e 1 mM PMSF (inibidor de Serino-Protease) foram adicionados e mantidos em repouso por 60 minutos no gelo (TAMBOURGI *et al.*, 2000). Em seguida, foram adicionados os eritrócitos e incubados homogeneizando à 37 °C em B.O.D por 24 horas. Os controles negativos também foram incubados com tampão e inibidores enzimáticos para verificar qualquer interferência nos brancos.

3.2.9 Avaliação da interferência dos sistemas ABO e Rh na hemólise direta

O ensaio hemolítico foi conduzido como descrito por HARRIS e PHOENIX, 1997. O procedimento foi o mesmo descrito no item 3.2.7 utilizando-se o tampão Tris/Sucrose. No entanto, foram utilizados eritrócitos lavados dos Tipos A⁺, B⁺, O⁺, O⁻ e AB⁺ previamente fenotipados em suspensões de 5×10^8 células/mL. Estas células (200µL) foram incubadas com 25µg/mL da toxina LiRecDT1 por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foram centrifugadas e a

absorbância do sobrenadante obtida em 550 nm. Foram aferidos também os controles negativos e positivos para cada tipo sanguíneo separadamente.

3.2.10 Verificação da atividade hemolítica direta sobre eritrócitos de diferentes animais

Este ensaio hemolítico também foi conduzido como descrito por HARRIS e PHOENIX, 1997. O procedimento foi o mesmo descrito anteriormente no item 3.2.7, utilizando-se o tampão Tris/Sucrose. Foram lavados 1 mL de sangue de camundongo, cavalo, carneiro, coelho e humano e as respectivas suspensões a 5×10^8 células/mL obtidas como já descrito. Utilizou-se 200 μ L dessas soluções (1×10^8 células), que então foram incubadas com 25 μ g/mL da toxina LiRecDT1 por 24 horas a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante obtido em 550 nm. Foram aferidos também os controles negativos e positivos para cada animal separadamente.

3.2.11 Análise morfológica dos eritrócitos

As células vermelhas do sangue foram lavadas três vezes em Tampão Ringer-NaCl (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 32 mM HEPES, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, pH 7.4, 300 mOsm/kg H₂O) e ressuspensas na mesma solução para se obter uma concentração de eritrócitos de aproximadamente de 0.05%, ou seja, a concentração foi ajustada para 5×10^8 células/mL. Aliquotas de 200 μ L da suspensão de eritrócitos, que corresponde à 1×10^8 células, foram incubadas conjuntamente com 200 μ L da solução de tratamento. As soluções de tratamento foram compostas por 5 μ g/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e do veneno de *L. intermedia* separadamente. As misturas resultantes foram incubadas a 37 °C em B.O.D, sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. Após os tempos de tratamento desejados (0, 4, 8, 16 e 24 horas), as células foram observadas e fotografadas usando-se microscópio invertido Leica-DMIL (Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma máquina digital Cybershot Sony 6.1 megapixels, como preconizado por UDDEN, 2005.

3.2.12 Análise ultraestrutural dos eritrócitos

O processamento dos eritrócitos para análise ultraestrutural foi executado como descrito por CHUNG e colaboradores (2007). Eritrócitos recém coletados foram lavados três vezes em Tampão Ringer-NaCl e ressuspensos para se obter uma concentração inicial de eritrócitos de aproximadamente de 0.05% ou 5×10^8 células/mL. Duzentos microlitros dessa suspensão foram incubados em separados, com 200 μ L da solução de tratamento, compostas por 5 μ g/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e 5 μ g/mL de veneno de *L. intermedia* por 0 e 8 horas a 37 °C em B.O.D sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. O processamento das amostras consistiu na remoção do tampão, lavagem dos eritrócitos em solução de Ringer e fixação, por 60 minutos, com glutaraldeído 2% em solução de Ringer, à 4°C sob agitação. Posteriormente, os eritrócitos foram novamente lavados e acomodados sobre lamínulas redondas e secos à temperatura ambiente. Em seguida, sofreram metalização em ouro e as lâminas foram observadas com Microscópio de Varredura JEOL J.S.M-6360 L.V. (Mariland, EUA).

3.2.13 Alteração do tamanho eritrócitário

O tamanho celular foi avaliado por citometria de fluxo utilizando-se um instrumento FACS-CALIBUR, Becton Dickinson, (New Jersey, USA), segundo SHUMILINA *et al.*, 2006. Para isso, sangue humano recém coletado foi lavado três vezes e ressuspenso em Tampão Ringer-NaCl para se obter uma concentração de eritrócitos de aproximadamente 1×10^6 células. Essa suspensão foi utilizada para a calibração do citometro de fluxo da seguinte forma, foi realizada a população normal dos eritrócitos e a padronização dos seus parâmetros normais. As amostras de eritrócitos consistiam em 1×10^6 células incubadas com 25 μ g/mL de toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e 25 μ g/mL de veneno de *L. intermedia*. As misturas resultantes ficaram incubadas a 37°C em B.O.D sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. Após o tempo de incubação desejado, 24 horas, as amostras foram analisadas (100.000 eventos) em função do tamanho das células (FSC). A análise estatística dos resultados e a confecção dos histogramas sobrepostos foram realizados utilizando-se o programa CellQuest.

3.2.14 Análise da ligação da LiRecDT1-GFP

A Análise da ligação da toxina LiRecDT1-GFP foi também observada por citometria de fluxo, em que os eritrócitos lavados (5×10^6 células) foram incubados com $25 \mu\text{g/mL}$ de toxina recombinante fluorescente (24 horas, 37°C) num volume total de $400 \mu\text{L}$ de Ringer. As amostras foram diluídas em 1 mL de Ringer e então processadas. A presença de fluorescência (canal FL1-H), autofluorescência (células e tampão) e a possível ligação inespecífica da GFP (tratamento apenas com GFP) foram avaliadas. Finalmente, foram montadas lamínas e observadas em Microscópio Confocal como descrito no item 3.2.15.

3.2.15 Ensaio de imunofluorescência

Este ensaio teve como intuito verificar a ligação do veneno ou das toxinas recombinantes na membrana externa do eritrócito e se existe algum padrão característico de ligação na superfície da célula. Para isso, procedeu-se como KALFA e colaboradores (2006) e VOJTOVÁ e colaboradores (2006), porém com algumas modificações como o descrito abaixo. Inicialmente, os eritrócitos lavados foram incubados por $\frac{1}{2}$, 2, 4, 8, 16 e 24 horas na B.O.D a 37°C , sob agitação, com $25 \mu\text{g/mL}$ das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e com $25 \mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*. Posteriormente à incubação, as amostras foram lavadas com PBS (KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, pH 7.2, 304 mOsm/kg H_2O) e fixadas com Glutaraldeído 0,1% (EMS, Whashington, EUA) em PBS por 10 minutos à 4°C em suspensão e em movimento. Após a fixação, os radicais aldeídicos foram bloqueados com Glicina 0,1M, 2% SFB e 1mg/ml de BSA em PBS por 60 minutos. Essas amostras foram, então, lavadas com PBS acrescido de 1mg/ml de BSA.

Para detecção do veneno de *L. intermedia*, assim como de cada uma das toxinas recombinantes, foram utilizados anticorpos policlonais obtidos de coelhos, hiperimunizados com $10 \mu\text{g/ml}$ de veneno bruto de *L. intermedia* ou com $10 \mu\text{g/ml}$ da toxina recombinante LiRecDT1, produzida pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de venenos - UFPR (LUCIANO *et al.*, 2004). Como anticorpo secundário, se empregou um anti-IgG de coelho conjugado com FITC na diluição de 1:250. Foram incubados com os eritrócitos, anti-veneno (α -

Vn) e anti-LiRecDT1 (α -DT1) diluídos em PBS/BSA, por 2 horas em temperatura ambiente e sob homogeneização. Posteriormente, as amostras foram lavadas novamente com tampão PBS/BSA e, então, incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (α -IgG de coelho) conjugado com FITC por 60 minutos, no escuro. As amostras foram lavadas novamente com PBS e 100 μ L de cada amostra foi acomodada em contato (gota espessa) com as lâminas. Por precaução, foram utilizadas lâminas brancas (GLASS TÉCNICA) que não apresentam autofluorescência e previamente processadas com 200 μ L de poli-L-lisina (50 μ g/mL) por 1 hora. A utilização da poli-L-lisina se faz necessária devido à baixa aderência dos eritrócitos ao vidro (células de ancoragem independente) e que, por interações eletrostáticas, se ligam à poli-L-lisina, fixando-se na lâmina.

Em seguida foram mergulhadas rapidamente em PBS para retirada dos eritrócitos livres. Para finalizar, as lâminas foram montadas com 50 μ L de Fluormont G (2:1 em PBS), vedadas com esmalte isento de formol e observadas em microscópio confocal Radiance 2100 (BioRad), acoplado a um microscópio de fluorescência (NIKON ECLIPSE 800). Como controle das reações, se empregou eritrócitos sem tratamento e sem anticorpos. Da mesma forma, foi realizado controle de eritrócitos não tratados com as proteínas, mas expostos aos anticorpos primário e secundário para verificar a especificidade dos anticorpos. Se-empregou, também, os eritrócitos com a omissão dos anticorpos primários.

A quantificação desta ligação foi realizada adicionalmente por citometria de fluxo utilizando o mesmo procedimento de imunomarcção descrito para microscopia confocal, porém com as células em suspensão.

3.2.16 Ensaio para a marcação de microdomínios lipídicos

Neste ensaio foi utilizado o sistema **Vybrant[®] Lipid Raft Labeling Kits** (Invitrogen – USA), o qual se baseia na alta afinidade da subunidade-B da toxina do cólera (CT-B) por Monossialogangliosídeo (GM1), que também está presente em grande quantidade nos microdomínios lipídicos.

Desse modo, eritrócitos recém coletados foram lavados e 1×10^8 células ressuspensas em 2mL de solução Ringer contendo 2 μ L de uma solução 1mg/mL de “CT-B” conjugado com Alexa Flúor 594. A mistura foi incubada por 10 minutos à 4°C. Em seguida, as células foram lavadas delicadamente com tampão Ringer. Posteriormente, foi realizada a ligação cruzada com

os microdomínios marcados com CT-B, utilizando o anticorpo anti-CT-B, na diluição 1:1000 (2µL de anticorpo “1 mg/mL” em 2mL), e incubando-se por 15 minutos à 4°C.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas e lavadas com solução de Ringer, e os eritrócitos fixados com glutaraldeído 0,1% e bloqueados como descrito anteriormente. Finalmente, foram montadas as lâminas para visualização dos eritrócitos marcados.

3.2.17 Análise da expressão de fosfatidilserina

Este ensaio foi realizado conforme descrito por AMARANTES-MENDES (1998) em que os eritrócitos recém coletados e lavados 1×10^8 células. Cem microlitros da amostra foram incubados com 25µg/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A assim como com 25µg/mL de veneno de *L. intermedia* por 4 horas. Após incubação foram lavados e ressuspensos em tampão de ligação para anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7.4) e adicionados 5µl de anexina V marcada com fluoresceína (FITC) (Invitrogen – USA) por 30 minutos, protegido da luz, em temperatura ambiente. Essas amostras devem ser mantidas protegidas da luz em temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 400µL de tampão de ligação, misturando-se gentilmente, mantidos sobre gelo até o momento da leitura.

3.2.18 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas “método Paramétrico Tukey”, através dos programas GraphPad Instant e Prisma (versão 3.0 / Windows 2000). Os valores \pm erro padrão da média (EPM) foram utilizados (*P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001) de acordo com o desenho experimental.

RESULTADOS

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão heteróloga de toxinas em sistemas procarióticos

O cDNA referente às toxinas de interesse foram amplificados por PCR, digeridos com enzimas de restrição e subclonados em vetores de expressão apropriados (pET-14b). As construções nestes vetores foram utilizadas na transformação de cepas de *E. coli* adequadas para a expressão, BL21(DE3)pLysS (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008). A indução da expressão foi realizada pela adição de IPTG e as culturas foram incubadas por um período adicional de 3,5h a 30 °C. As toxinas recombinantes (LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e EGFP-LiRecDT1), proteínas de fusão contendo cauda de histidina, foram purificadas através de coluna de Ni-NTA agarose. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE, reunidas e dialisadas contra PBS. As toxinas recombinantes assim purificadas foram dosadas (BRADFORD, 1976) e foram mantidas a -80°C até o momento do uso. A massa molecular e a pureza das proteínas recombinantes foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%. Na Figura 11, podemos observar o SDS-PAGE referente ao processo de expressão e purificação da toxina recombinante LiRecDT1. Verificamos, ainda, no gel a ausência de outras bandas, confirmando que não existem proteínas contaminantes da preparação, sendo a cromatografia em Ni-NTA eficiente na purificação.

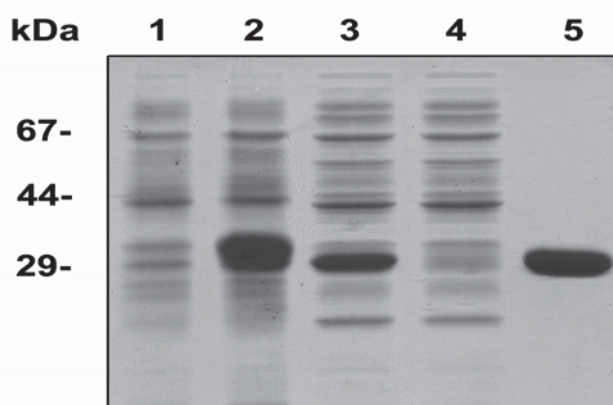


Figura 11: Análise da expressão da toxina recombinante LiRecDT1 em SDS-PAGE corado por Coomassie blue. As colunas 1 e 2 indicam respectivamente amostras de BL21(DE3)pLysS antes e após a indução da proteína recombinante. Nas colunas 3, 4 e 5 estão representados, respectivamente, o sobrenadante do lisado de células obtido por congelamento antes e depois da incubação com a resina Ni-NTA agarose e a proteína recombinante eluída.

4.2 Curva dose-resposta da atividade hemolítica direta do veneno de *L. intermedia* e da toxina recombinante LiRecDT1

Para avaliar a capacidade hemolítica do veneno de *L. intermedia* sobre eritrócitos humanos foram realizados experimentos que avaliaram sua capacidade em promover diretamente hemólise de eritrócitos humanos “*in vitro*”. Também utilizamos uma ferramenta biotecnológica, a toxina recombinante LiRecDT1, nestes experimentos com intuito de elucidar a participação da toxina dermonecrótica no evento hemolítico.

Nestes experimentos suspensão de eritrócitos humanos lavados (1×10^8 células), na ausência de soro, foi incubada com concentrações crescentes (0, 0.025, 0.25, 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$) de veneno bruto ou de LiRecDT1, por 24 horas a 37 °C. O experimento foi realizado em tampão Tris/Sucrose e a atividade hemolítica direta foi observada através da medida da hemoglobina liberada, obtida 550nm. Os resultados do efeito hemolítico foram expressos em porcentagem, comparando os valores das amostras com o do controle positivo, contendo Triton 0,1%, para o qual atribuiu-se 100% hemólise. Para assegurar que as condições de ensaio estavam adequadas e nenhum outro fator experimental estaria interferindo no efeito hemolítico observado foi realizado, em todos os experimentos, um controle negativo onde não deveria ser observada hemólise (eritrócitos incubados somente com tampão).

Os resultados destes experimentos (Gráfico 4) mostram curvas muito semelhantes tanto para o veneno de *L. intermedia* como para a LiRecDT1. Os resultados mostram, ainda, que o veneno bruto de *L. intermedia* apresentou, nas doses de 0.025 e 0.25 $\mu\text{g/mL}$, um efeito hemolítico direto cerca de 15% maior que o obtido com a toxina recombinante LiRecDT1, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. Já nas doses de 2.5 e 25 $\mu\text{g/mL}$, os resultados de hemólise direta foram praticamente os mesmos entre o veneno e a LiRecDT1. A porcentagem de hemólise, após 24 horas, foi de 59% e de 74% nas doses de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Estes resultados mostram que o veneno de *L. intermedia* e a fosfolipase-D recombinante possuem atividade hemolítica direta sobre eritrócitos humanos, uma vez que nas condições experimentais utilizadas não ocorre participação do complemento no processo de lise celular já que o ensaio foi realizado na ausência de soro. Além disso, o efeito hemolítico se mostrou diretamente proporcional à concentração de veneno/toxina recombinante utilizada. A atividade hemolítica da toxina recombinante LiRecDT1 sobre os eritrócitos mostra que a fosfolipase-D participa do efeito hemolítico do veneno de *L.*

intermedia, e que talvez esta classe de enzimas seja a principal responsável pela atividade hemolítica do veneno bruto.

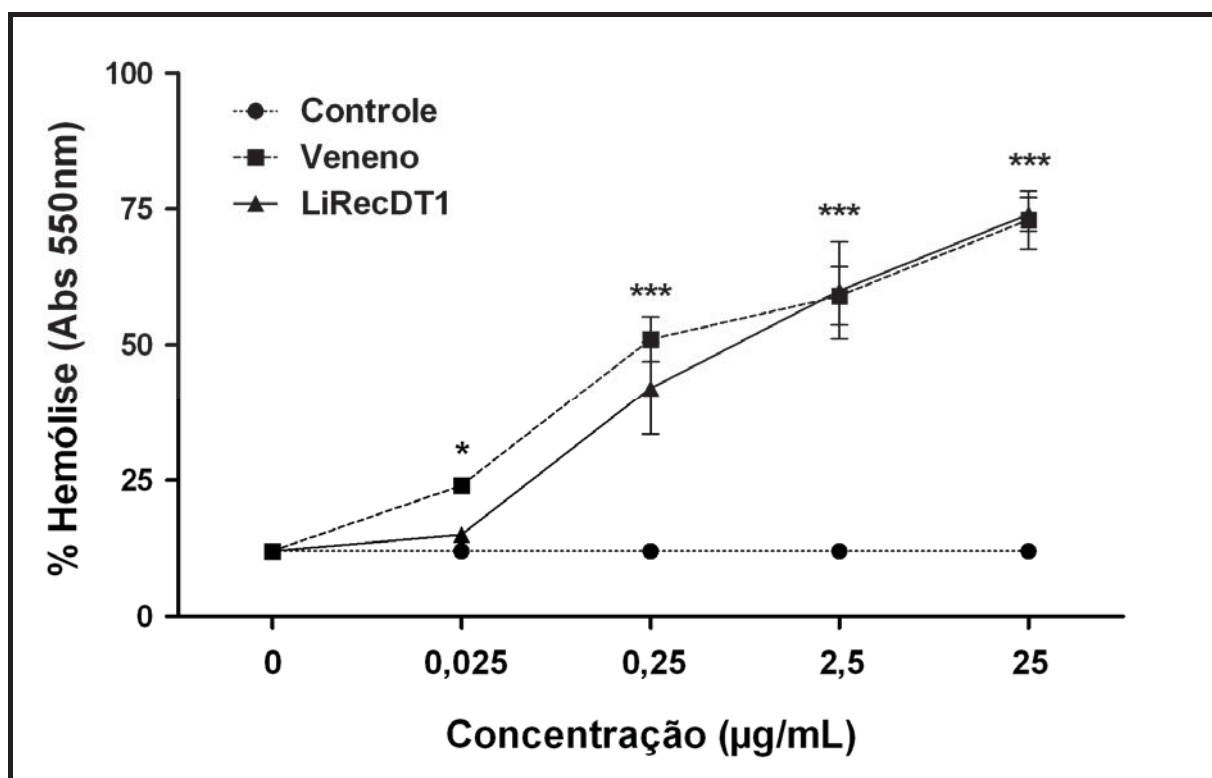


Gráfico 4: Hemólise direta do veneno de *L. intermedia* e da toxina recombinante LiRecDT1. O efeito hemolítico das toxinas foi determinado após 24 h e nas concentrações indicadas. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média \pm SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

4.3 Tempo-dependência da atividade hemolítica direta do veneno de *L. intermedia* e da toxina recombinante LiRecDT1

Uma vez sugerido que, nas condições experimentais utilizadas, a fosfolipase-D poderia ser a principal responsável pela atividade hemolítica do veneno de *L. intermedia* “*in vitro*”, verificamos se a atividade de LiRecDT1 sobre os eritrócitos seria tempo-dependente. Realizamos, para tanto, um estudo cinético do efeito hemolítico direto do veneno bruto e da toxina recombinante: os eritrócitos humanos (1×10^8 células) foram incubados com 25 µg/mL de veneno bruto, assim como com 25 µg/mL de LiRecDT1 e o efeito avaliado após 0, 4, 8, 16 e 24 horas através da hemoglobina liberada e mensurada em 550 nm, como descrito

anteriormente. Os resultados experimentais mostrados no Gráfico 5 evidenciam uma relação diretamente proporcional entre a hemólise direta e o tempo de incubação com o veneno bruto ou com a toxina LiRecDT1.

A toxina LiRecDT1 apresenta efeito hemolítico direto sobre os eritrócitos humanos já a partir de 4 horas de incubação (18% de hemólise) e chega a um efeito hemolítico de cerca de 50% após 16 horas de tratamento. No maior tempo ensaiado, (24 h) observamos 72% de hemólise direta, enquanto o controle negativo não apresentou hemólise significativa, cerca de 5%, em nenhum dos tempos, assegurando a qualidade dos resultados obtidos.

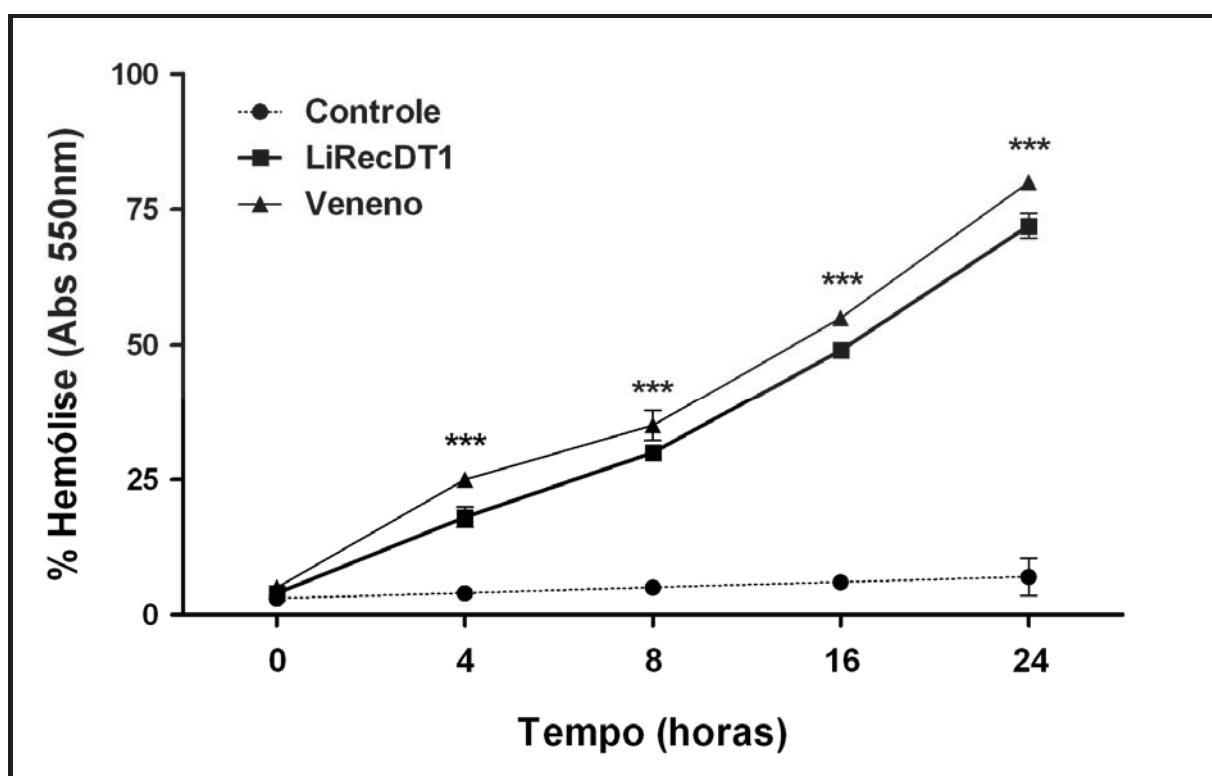


Gráfico 5: Cinética da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1. O efeito hemolítico da toxina selvagem foi determinado após 0, 4, 8, 16 e 24h e na concentração de 25µg/mL. O experimento foi realizado em pentaplicata e os valores dados pela média ± SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como (***) $P \leq 0,001$.

Os dados cinéticos da atividade hemolítica direta da toxina LiRecDT1 sugerem que sua atividade sobre os eritrócitos é dependente do tempo (50% de hemólise) em 16 h. Além disso, esta toxina permanece ativa e deletéria mesmo após 24 h de incubação

experimental. Além disso, a cinética de atividade hemolítica direta do veneno bruto foi muito semelhante à da toxina recombinante LiRecDT1. Isso corrobora as indicações anteriores, que sugerem fortemente que a família das fosfolipases-D seja a responsável pela atividade hemolítica demonstrada pelo veneno bruto.

4.4 Curva dose-resposta e curva tempo-dependente da atividade hemolítica direta da LiRecDT1 e da LiRecDT1 H12A

Os dados mostrados até o momento sugerem que a atividade hemolítica presente no veneno da aranha marrom seria resultado da atividade catalítica das toxinas dermonecróticas, as fosfolipases-D. Com o objetivo de avaliar se a atividade fosfolipásica teria realmente um papel central no efeito hemolítico direto observado “*in vitro*” sobre os eritrócitos humanos, utilizamos a toxina LiRecDT1 H12A (KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2008), outra ferramenta biotecnológica desenvolvida pelo nosso grupo. Trata-se da LiRecDT1, que sofreu uma mutação sítio dirigida na sua seqüência aminoacídica, tendo a histidina da posição 12 substituída por uma alanina. Esta mutação foi realizada exatamente no sítio catalítico da fosfolipase-D. Existem duas histidinas no sítio catalítico da enzima (H12 e H47) e estas têm sido reportadas como as responsáveis pela atividade fosfolipásica da toxina dermonecrótica presente no veneno, sendo essenciais para a atividade catalítica da enzima (MURAKAMI *et al.*, 2006). A substituição da histidina da posição 12 por uma alanina, que é um aminoácido neutro e um dos mais simples em estrutura molecular, altera a capacidade catalítica da enzima, uma vez que a A12 não é capaz de exercer o mesmo efeito da H12 na atividade enzimática da toxina. Estes dados foram confirmados após a clonagem, expressão e purificação da toxina LiRecDT1 H12A, que apresentou, além de redução drástica da atividade catalítica SMase-D, redução na capacidade de desenvolver dermonecrose em pele de coelhos.

Para avaliar a relação entre a atividade catalítica das toxinas dermonecróticas com o efeito hemolítico produzido pelo veneno de *L. intermedia*, realizamos um ensaio do tipo curva dose-resposta com a toxina mutada LiRecDT1 H12A. Outro experimento do tipo curva tempo-dependente também foi realizado com a toxina LiRecDT1 H12A. Neste ensaio a toxina recombinante LiRecDT1 foi novamente ensaiada para efeito de comparação. Como nos experimentos anteriores foram realizados controles positivo e negativo do efeito hemolítico direto sobre os eritrócitos.

Nos ensaios da curva dose-resposta (Gráfico 6), os eritrócitos humanos foram incubados com as toxinas LiRecDT1 ou LiRecDT1 H12A nas concentrações de 0, 0,025, 0,25, 2,5 e 25 μ g/mL por 24 horas e, após este período, o efeito hemolítico foi observado através da hemoglobina liberada mensurada em 550nm. Não foi observado efeito hemolítico significativo em nenhuma das concentrações de LiRecDT1 H12A testadas. Já o perfil da atividade hemolítica direta da LiRecDT1 sobre eritrócitos humanos foi o mesmo do observado nos experimentos anteriores (Gráfico 4).

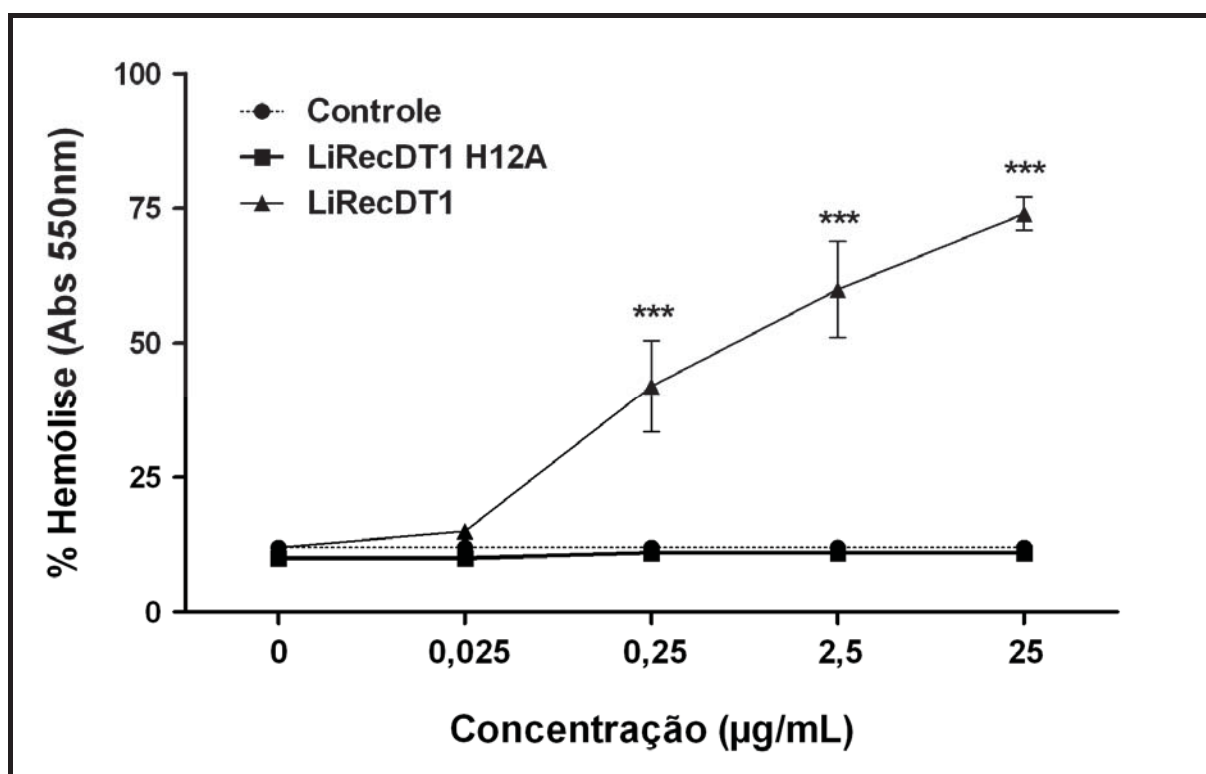


Gráfico 6: Hemólise direta da LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. O efeito hemolítico das toxinas foi determinado após 24h e nas concentrações indicadas. O experimento foi realizado em pentaplicata e os valores dados pela média \pm SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como (***) $P \leq 0,001$.

No ensaio cinético da atividade hemolítica de LiRecDT1 H12A (Gráfico 7), 25 μ g/mL dessa toxina foram incubados por 0, 4, 8, 16 e 24 horas com eritrócitos humanos (1×10^8 células) e a hemólise foi avaliada como descrito anteriormente. Não foi observada

hemólise ao longo do período de incubação de LiRecDT1 H12A com os eritrócitos em nenhum dos tempos avaliados. A toxina LiRecDT1 novamente apresentou o mesmo perfil de hemólise já observado (Gráfico 5), chegando a 73% de hemólise direta a 25 μ g/mL. Os resultados obtidos nos dois ensaios (dose-efeito e tempo-dependente) para a toxina mutada LiRecDT1 H12A, não foram significativamente diferentes do controle negativo. Estes resultados sugerem que o efeito hemolítico direto observado nos ensaios “*in vitro*” são dependentes da atividade fosfolipásica da toxina LiRecDT1. Além disso, os dados confirmam que o efeito hemolítico provocado pelo veneno de *L. intermedia in vivo* está intimamente relacionado com a atividade fosfolipásica das toxinas dermonecroticas (PLDs).

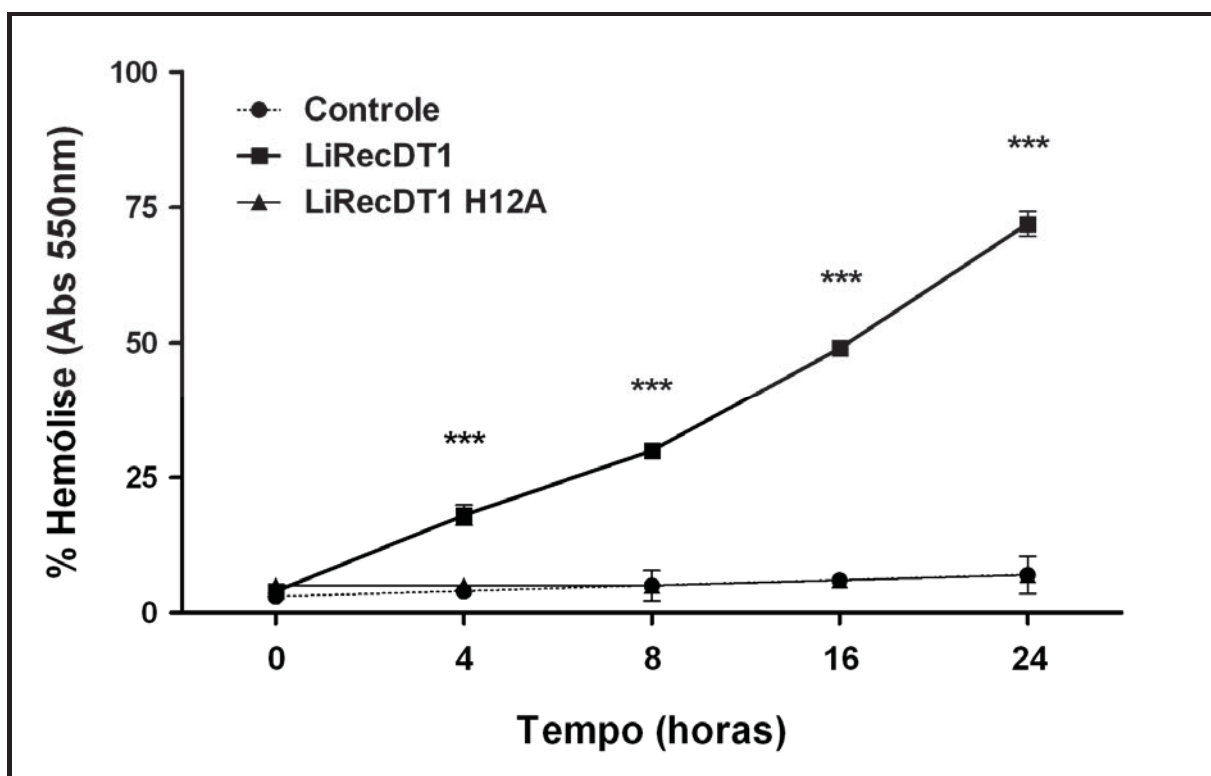


Gráfico 7: Cinética da toxina recombinante LiRecDT1 H12A. O efeito hemolítico da toxina mutada foi determinado após 0, 4, 8, 16 e 24h, na concentração de 25 μ g/mL. O experimento foi realizado em pentaplicata e os valores representam a porcentagem média \pm SEM. A significância é definida como *** $P \leq 0,001$.

4.5 Inibição da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1 por agentes quelantes de cátions divalentes

Os dois resíduos de histidinas (H12 e H47) do sítio catalítico são essenciais para a atividade enzimática das fosfolipases-D (PLDs), porém, além destes, existe outro ponto importante vinculado à atividade dessa classe de toxinas: o íon magnésio (Mg^{+2}). Como discutido na introdução, esse íon encontra-se complexado com os resíduos Glu32, Asp34 e Asp91 da cadeia aminoacídica das PLDs e por uma molécula de água (Figura 6), compondo o sítio ativo das toxinas, que é extremamente conservado entre as espécies de *Loxosceles*. Isto sugere que o Mg^{+2} desempenha um papel-chave na atividade catalítica da enzima (MURAKAMI *et al.*, 2005 e 2006). No intuito de avaliar a participação do íon magnésio no efeito hemolítico direto provocado pela toxina LiRecDT1 realizamos os ensaios de hemólise “*in vitro*” na presença de diferentes quelantes de metais divalentes. Estes compostos são amplamente utilizados para inibir enzimas que dependem de metal como co-fator enzimático. Utilizamos EGTA, que possui uma alta afinidade por Ca^{+2} (LU, 1992), EDTA que possui alta afinidade por Mg^{+2} (GODT e LINDLEY, 1982), e 1,10-fenantrolina, que possui uma alta afinidade por Zn^{+2} (TAMBOURGI, 2000). Como controle experimental, para descartar a possibilidade de uma atividade proteolítica da toxina, utilizou-se um inibidor de serino-protease, o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), o qual possui a capacidade de ligar-se a um aminoácido essencial dessa classe de enzimas, que é a serina do sítio catalítico, provocando uma ligação irreversível e inativando-a (LARK *et al.*, 1990). As serino-proteases são frequentemente encontradas em venenos de serpentes, como é o caso da *Bothrops jararacussu* (SANT’ANA, 2005). Porém, o PMSF não promove nenhuma interferência na atividade fosfolipásica, já que essa é independente de serina.

Os ensaios de hemólise direta foram realizados incubando-se, primeiramente, a toxina LiRecDT1 (25 μ g/mL) com os diferentes inibidores enzimáticos por 1 hora. Utilizou-se 1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 1 mM de 1,10-fenantrolina e 1 mM de PMSF. Após este período, os eritrócitos humanos foram adicionados às amostras e estas foram incubadas por 24 horas. Ao final do tempo de incubação, a hemólise foi verificada através da quantificação da hemoglobina liberada como discutido anteriormente. Foi, também, realizado um controle positivo, em que a toxina LiRecDT1 foi incubada apenas com tampão, e um controle negativo, onde não se observou hemólise significativa.

Os resultados (Gráfico 8) mostram que a toxina LiRecDT1, na ausência de inibidores enzimáticos causou, mais de 70% de hemólise nos eritrócitos. A utilização dos quelantes de metal divalente proporcionou uma redução significativa da porcentagem de hemólise. O EDTA foi o responsável pela maior taxa de inibição da hemólise direta, apresentando um perfil igual ao do controle negativo, o que caracterizou uma inibição de 100% de hemólise. Já os inibidores EGTA e 1,10-fenantrolina apresentaram taxas de hemólise de 30% e 31%, respectivamente, o que caracterizou uma inibição de 42,8 % e 44,3% de hemólise respectivamente. O inibidor de serino-protease, PMSF, não alterou a atividade hemolítica direta da toxina LiRecDT1, já que essa não possui atividade proteolítica, excluindo qualquer atividade de serino-protease no efeito hemolítico.

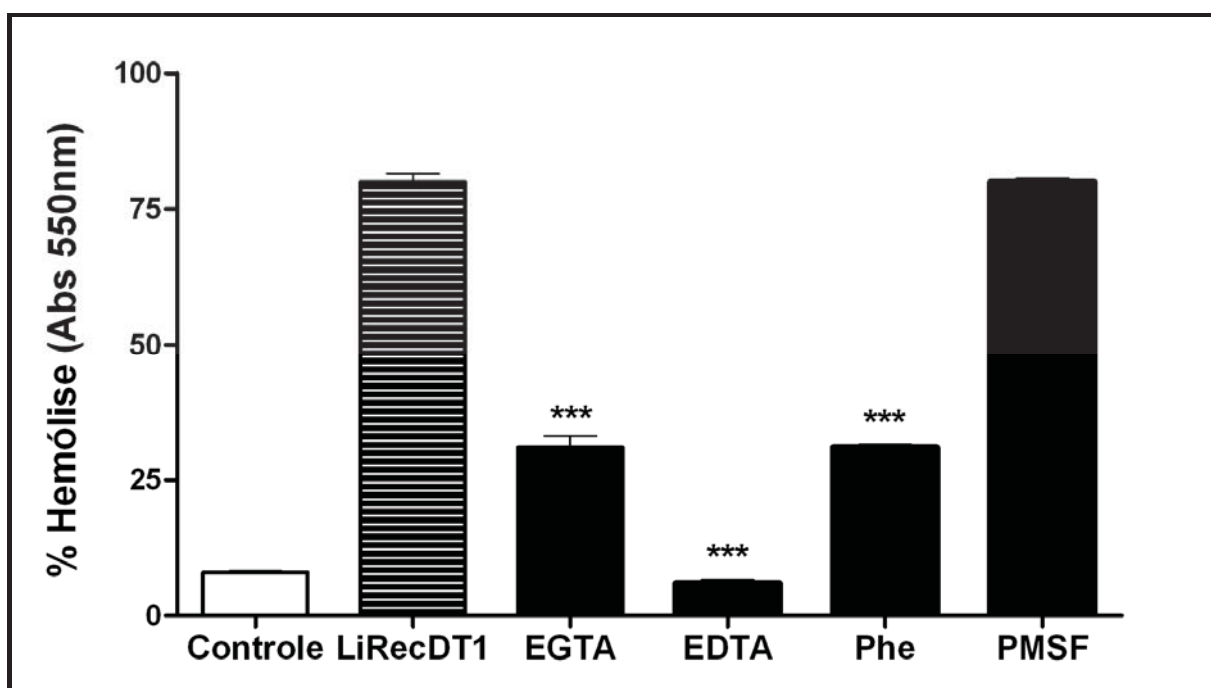


Gráfico 8: Interferência de quelantes na atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1. Aliquotas na concentração de 25µg/mL de toxina foram incubadas com 1 mM de EGTA, EDTA, 1,10-Fenantrolina e PMSF, por 1 hora em gelo. Em seguida, suspensão de eritrócitos (10^8) foi adicionada e as misturas reincubadas por 24 horas a 37 °C. A hemólise foi obtida, após leitura em 550nm, em relação ao controle positivo (Triton X-100), para o qual se atribuiu 100% de hemólise. O experimento foi realizado em pentaplicata e os valores dados pela média \pm SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como *** $P \leq 0,001$.

Os eritrócitos foram incubados com EGTA, EDTA, 1,10-fenantrolina e PMSF, na ausência da toxina, pelo mesmo período de tempo e nas mesmas condições experimentais, na qual não foi observada hemólise (dado não mostrado).

A alta taxa de inibição do efeito hemolítico provocada pelo EDTA deve-se, provavelmente, a sua grande afinidade por íons Mg^{+2} . Os inibidores EGTA e 1,10-fenantrolina também possuem afinidade pelo magnésio, contudo o EDTA apresenta a menor constante de dissociação para o íon Mg^{+2} . Os resultados sugerem que estes quelantes de metais divalentes estão seqüestrando o Mg^{+2} do sítio ativo da enzima e interferindo com a sua atividade catalítica. Estes dados corroboram com dados da literatura (MURAKAMI *et al.*, 2005 e 2006) que sugerem a importância do íon magnésio para a atividade catalítica das toxinas fosfolipases-D loxoscélicas.

4.6 Avaliação da interferência dos sistemas ABO e Rh na Atividade hemolítica

Os dados de atividade hemolítica encontrados na literatura são, em sua grande maioria, resultados de experimentos com eritrócitos do tipo O^+ . Isto se deve ao fato de que normalmente os ensaios avaliaram a hemólise dependente de complemento, e nestes casos, o uso de amostra de outro tipo sanguíneo seria inviável, pois devido à presença de anticorpos anti-A e/ou anti-B, as proteínas do complemento poderiam reconhecer esses anticorpos e desencadear hemólise “*in vitro*”. Contudo, os nossos experimentos de avaliação da hemólise direta possibilitaram avaliar se os antígenos dos sistemas ABO e Rh poderiam apresentar algum tipo de interferência na atividade hemolítica da toxina recombinante LiRecDT1.

Nestes experimentos, utilizamos a toxina recombinante LiRecDT1 na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e esta foi incubada por 24 horas com eritrócitos humanos lavados. Após este período, a hemólise foi mensurada em 550nm através da hemoglobina liberada. Para cada tipo sanguíneo foi realizado um controle negativo, no qual as células foram incubadas somente com o tampão. Na Figura 9, estão apresentados os resultados de atividade hemolítica da LiRecDT1 sobre os eritrócitos dos diferentes tipos sanguíneos. Nas condições experimentais estudadas, não foi observada nenhuma diferença significativa na taxa de hemólise dos eritrócitos A^+ , B^+ , AB^+ , O^+ e O^- induzida pelo tratamento com LiRecDT1.

Estes resultados indicam que as diferenças entre os antígenos A e B do sistema ABO, e o D, do sistema Rh não interferem na atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1.

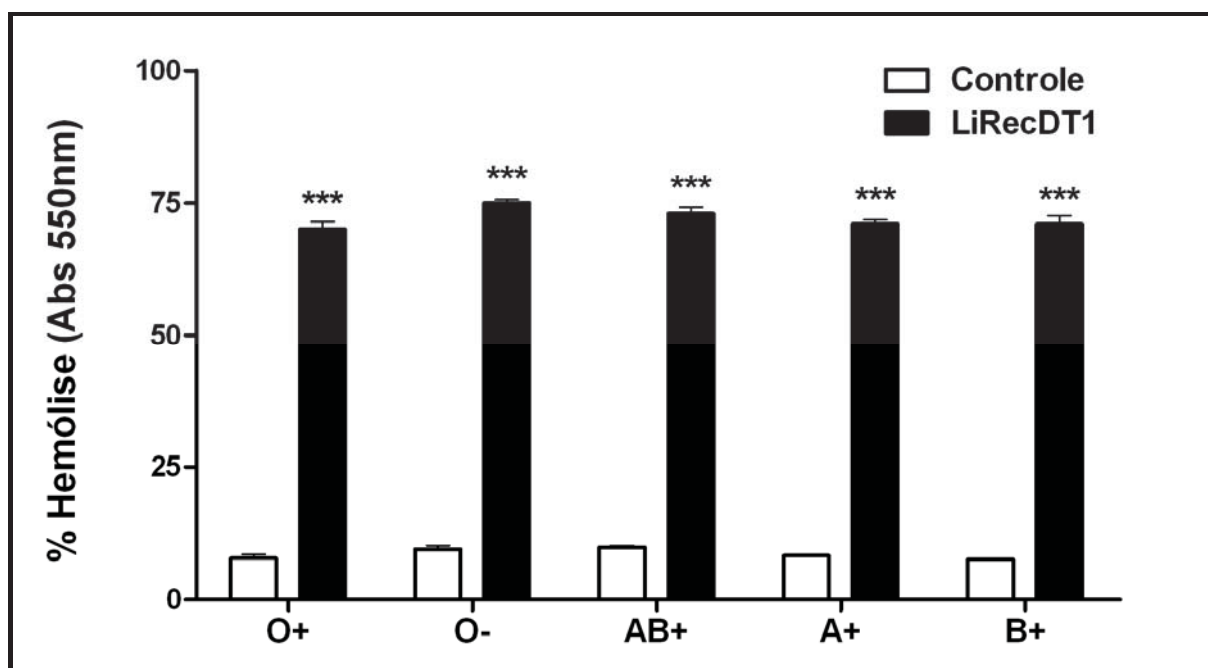


Gráfico 9: Influência dos Sistemas ABO e Rh na atividade hemolítica direta da toxina LiRecDT1. Os tipos sanguíneos foram incubados com 25µg/mL de toxina por 24 horas. O experimento foi realizado em pentaplicata e os valores dados pela média ± SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como *** $P \leq 0,001$.

4.7 Verificação da atividade hemolítica direta sobre eritrócitos de diferentes animais

A toxina recombinante LiRecDT1 foi avaliada quanto à atividade hemolítica direta em eritrócitos de diferentes mamíferos. Sabemos com base na literatura científica que existe diferença na proporção de esfingomiéline e fosfatidilcolina que compõem a membrana plasmática eritrocitária dependendo da espécie de mamíferos. Portanto, a composição fosfolipídica dos eritrócitos poderia torná-los mais ou menos susceptíveis à hemólise causada pela atividade fosfolipásica da toxina recombinante LiRecDT1. Como apresentado na introdução, camundongos, ratos e cavalos apresentam uma proporção menor de esfingomiéline na membrana do eritrócito, enquanto coelhos e humanos possuem uma porcentagem maior de esfingomiéline (OCHI *et al.*, 2003; OCHI *et al.*, 2004). Já os eritrócitos de carneiro são os que apresentam maior porcentagem de esfingomiéline entre esses mamíferos, consistindo em cerca de 50% do total de fosfolipídios (OCHI *et al.*, 2004). Para estes ensaios utilizamos as mesmas condições dos ensaios anteriores: a toxina recombinante

LiRecDT1 na concentração de 25µg/mL foi incubada com os diferentes eritrócitos (1×10^8 células) por 24 horas e o percentual de hemólise foi mensurado através da liberação de hemoglobina das amostras em 550nm, comparado aos valores obtidos do controle positivo 100% de hemólise. Para todos os tipos de eritrócitos foi realizado um controle negativo, em que as células foram incubadas somente com o tampão, assegurando que a hemólise observada realmente se devia à atividade da LiRecDT1. O Gráfico 10, ilustra os resultados obtidos nestes experimentos, onde os eritrócitos de cavalo não apresentaram hemólise significativa nestas condições. Já os eritrócitos de carneiro, coelho e humano mostraram taxas de hemólise, cerca de 90, 80 e 70%, respectivamente. Estes dados sugerem que existe uma relação entre a composição fosfolipídica da membrana do eritrócito e o evento hemolítico direto desencadeado pela LiRecDT1.

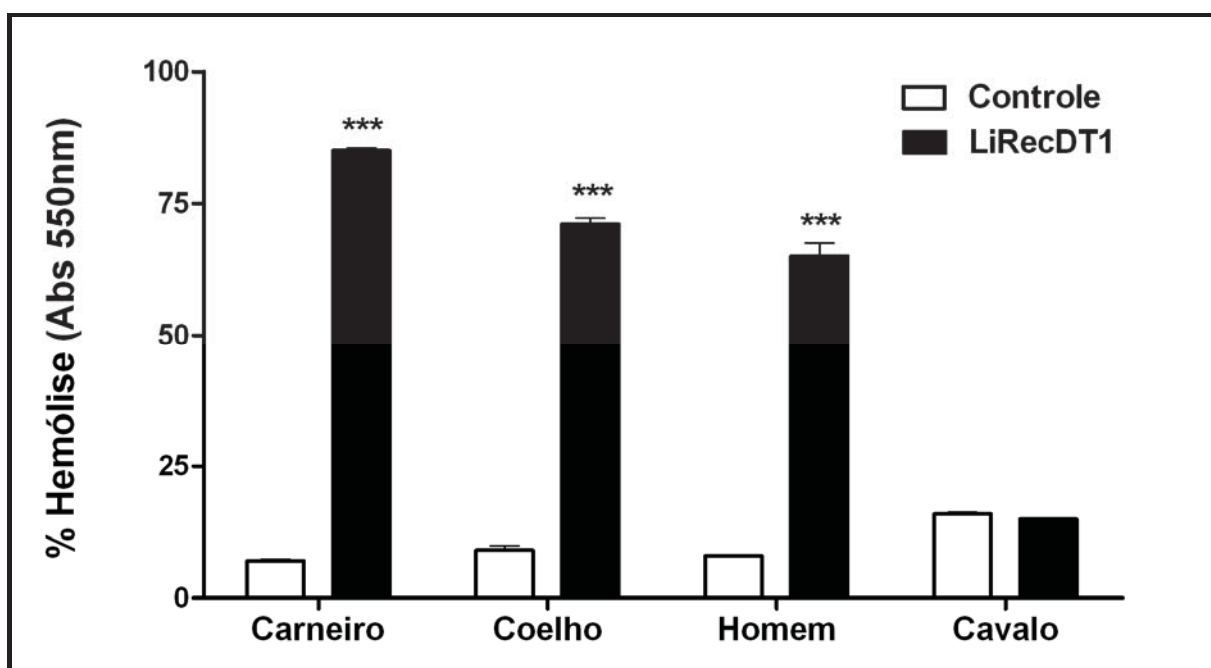


Gráfico 10: Atividade hemolítica direta da LiRecDT1 sobre diferentes eritrócitos. Eritrócitos diferentes foram incubados com a concentração de 25µg/mL de toxina por 24h. O experimento foi realizado em pentaplicata e os valores dados pela média \pm SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como $***P \leq 0,001$.

Observamos que a taxa de hemólise nestas condições experimentais foi diretamente proporcional à quantidade de esfingomiéline presente na membrana dos

eritrócitos, sendo os eritrócitos de carneiro (50% de esfingomielina) os mais susceptíveis à ação da LiRecDT1, seguidos pelos eritrócitos de coelho (20% de esfingomielina) e de humano (19% de esfingomielina). Os eritrócitos de cavalo, que possuem apenas 14% de esfingomielina, não apresentaram hemólise significativa. Os dados aqui apresentados sugerem um envolvimento do metabolismo da esfingomielina no efeito hemolítico direto observado com o tratamento com LiRecDT1. Estes dados fornecem indicativos para um possível mecanismo de ação da toxina LiRecDT1 sobre os eritrócitos, sugerindo que a ação de fosfolipase-D da toxina ocorre sobre a esfingomielina presente na membrana eritrocitária.

Durante os experimentos tentamos analisar o efeito da toxina LiRecDT1 sobre eritrócitos de camundongo, que apresentam uma porcentagem ainda menor de esfingomielina (9%). Porém, devido à grande instabilidade destes eritrócitos “*in vitro*” (INGRAHAM *et al.*, 1981) em que as células eram incubadas apenas com o tampão, também apresentava hemólise (dados não mostrados), inviabilizando a utilização destas células nos experimentos. Estes dados além de confirmarem os dados observados da relação entre a quantidade de esfingomielina e hemólise direta causada por LiRecDT1 também traria informações úteis para o entendimento do loxoscelismo, uma vez que camundongos não apresentam dermonecrose e não apresentam sinais de hemólise intravascular, como hemoglobinúria “*in vivo*”, contudo apresenta efeito nefrotóxico intenso, ocasionando letalidade (KUSMA *et al.*, 2008 *in press*).

4.8 Análise morfológica dos eritrócitos

Com o objetivo de avaliar o efeito das toxinas recombinantes sobre a morfologia de eritrócitos humanos, incubou-se uma suspensão de 10^8 células, com $5\mu\text{g/mL}$ de veneno bruto e das toxinas dermonecroticas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, por 0, 4, 8, 16 e 24 horas e analisou-se em microscópio invertido. No controle, observamos esses eritrócitos com a morfologia normal, incubados apenas com tampão e, portanto apresentando a sua morfologia característica de discócitos. Já as células tratadas com veneno de *L. intermedia* apresentaram mudanças morfológicas

que se acentuaram com o aumento do tempo de incubação. Encontramos formas semelhantes à estomatócitos (MIALE, 1982) desde os primeiros tempos de tratamento e formas semelhantes à esferócitos (MIALE, 1982) que aumentaram em quantidade com o passar do tempo de incubação. Estas alterações estão ilustradas na Figura 12. O tratamento com a toxina LiRecDT1 (5 μ g/mL) provocou o mesmo padrão de alterações morfológicas observadas com o veneno bruto de *L. intermedia*, sendo o número de estomatócitos e esferócitos encontrados proporcional ao tempo de incubação com a toxina. Foi possível observar, também, que o tamanho dos eritrócitos tratados, tanto com veneno bruto como com a toxina LiRecDT1, sofreram aparente redução de tamanho.

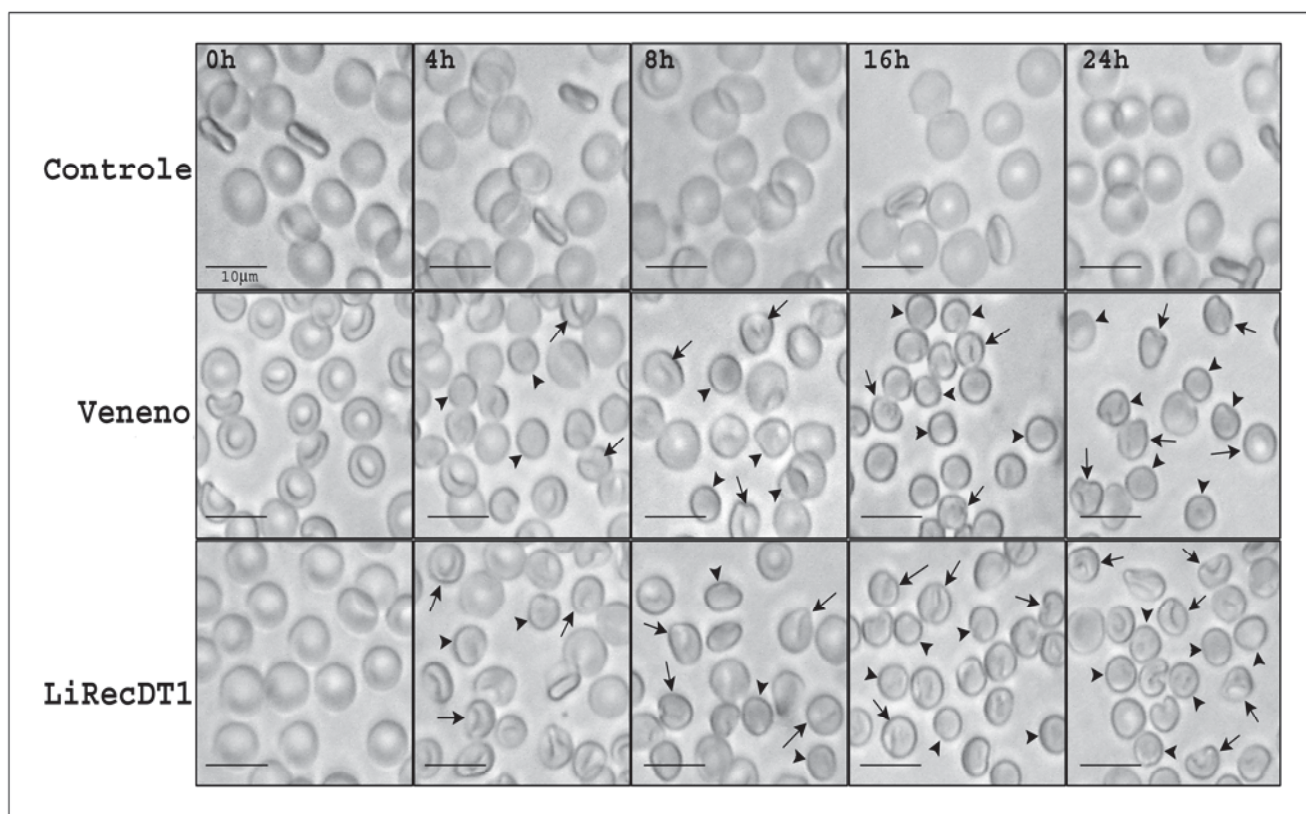


Figura 12: Alteração morfológica dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante LiRecDT1. As análises foram realizadas em 0, 4, 8, 16 e 24h após exposição, na concentração de 5 μ g/mL. Imagens adquiridas por microscopia de Luz em Aumento 400x. A Barra indica 10 μ m. *Setas pretas indicam eritrócitos alterados, que lembram estomatócitos. **Cabeças de setas indicam eritrócitos com redução de tamanho, perda do halo central e que se assemelham à esferócitos.

Em contraste, nas imagens dos eritrócitos tratados com 5 μ g/mL da toxina mutada LiRecDT1 H12A não foi possível observar alterações morfológicas nos tempos analisados, como ilustrado na Figura 13. Os eritrócitos tratados com LiRecDT1 H12A mantiveram sua forma normal de discócitos como aquela encontrada nas células do grupo controle durante todo o tempo de experimentação.

Estes resultados indicam que a atividade deletéria do veneno de *L. intermedia* sobre os eritrócitos está intimamente relacionada com a atividade catalítica das suas enzimas, uma vez que as alterações provocadas pela toxina LiRecDT1 e pelo veneno bruto foram muito similares em quantidade e intensidade, não sendo observadas com a toxina mutada. A ausência dessas alterações morfológicas após tratamento com a toxina mutada LiRecDT1 H12A sugerem, ainda, que a ação das toxinas do tipo fosfolipases-D é dependente de sua atividade catalítica, sendo a H12 essencial para os efeitos deletérios nos eritrócitos “*in vitro*”.

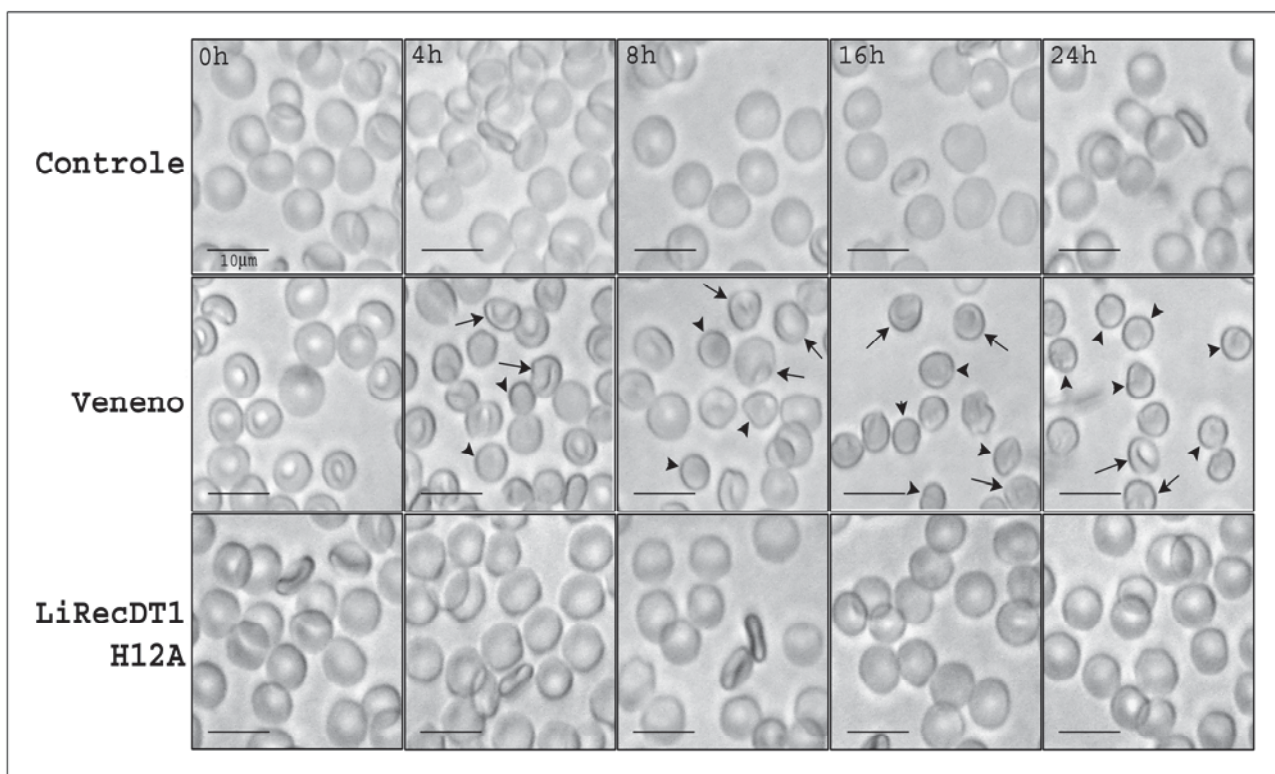


Figura 13: Alteração morfológica dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A. As análises foram realizadas em 0, 4, 8, 16 e 24h após exposição, na concentração de 5 μ g/mL. Imagens adquiridas por microscopia de Luz em Aumento 400x. A Barra indica 10 μ m. *Setas pretas indicam eritrócitos alterados, que lembram estomatócitos. **Cabeças de setas indicam eritrócitos com redução de tamanho, perda do halo central e que se assemelham à esferócitos.

4.9 Análise ultraestrutural dos eritrócitos

Como comentado anteriormente, o eritrócito é uma célula em forma de disco bicôncavo de aproximadamente 8µm de diâmetro com características de deformabilidade e superfície ideal para o transporte e a troca de gases com os tecidos (LEE *et al.*, 1999). O eritrócito torna-se o suporte físico que envolve as moléculas de hemoglobina, assegurando que estas desempenhem seu papel fisiológico com máxima eficiência. Considerando as limitações encontradas na microscopia de luz, como falta de resolução, pequeno aumento e nenhuma nomenclatura das alterações de forma padronizada em suspensão, apenas em extensão sanguínea corada, decidiu-se observar os eritrócitos em microscopia eletrônica, onde uma melhor análise estrutural possibilitaria classificar as alterações de forma previamente observadas, com critérios baseados na literatura. Avaliou-se assim, o efeito do veneno de *L. intermedia* e das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A sobre eritrócitos humanos utilizando microscopia eletrônica de varredura. Os eritrócitos humanos (1×10^6 células) foram incubados com veneno de *L. intermedia* ou com as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A (5µg/mL) por 0 e 8 horas e, após este tempo, o material foi processado para microscopia eletrônica de varredura.

Os resultados destes experimentos estão ilustrados nas Figuras 14 e 15, onde se pode observar, tanto nos eritrócitos tratados com veneno bruto, quanto naqueles tratados com a toxina LiRecDT1, alterações morfológicas marcantes e características de processos hemolíticos, como estomatócitos, acantócitos, knizócitos e esferócitos (MIALE, 1982). Essas alterações morfológicas observadas são muito similares às alterações morfológicas dos eritrócitos incubados com esfingomielinase-C de *S. aureus* e esfingomielinase-D de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que são toxinas hemolíticas conhecidas e possuidoras de ação enzimática sobre a membrana plasmática de eritrócitos (XU, LU e IHLER, 1995). Além disso, os eritrócitos da população controle e os eritrócitos tratados com a toxina mutada LiRecDT1 H12A não apresentaram nenhuma alteração de forma durante todo o tempo analisado, permanecendo como discócitos e com a evidente biconcavidade habitual, como notado nas Figuras 14 e 15.

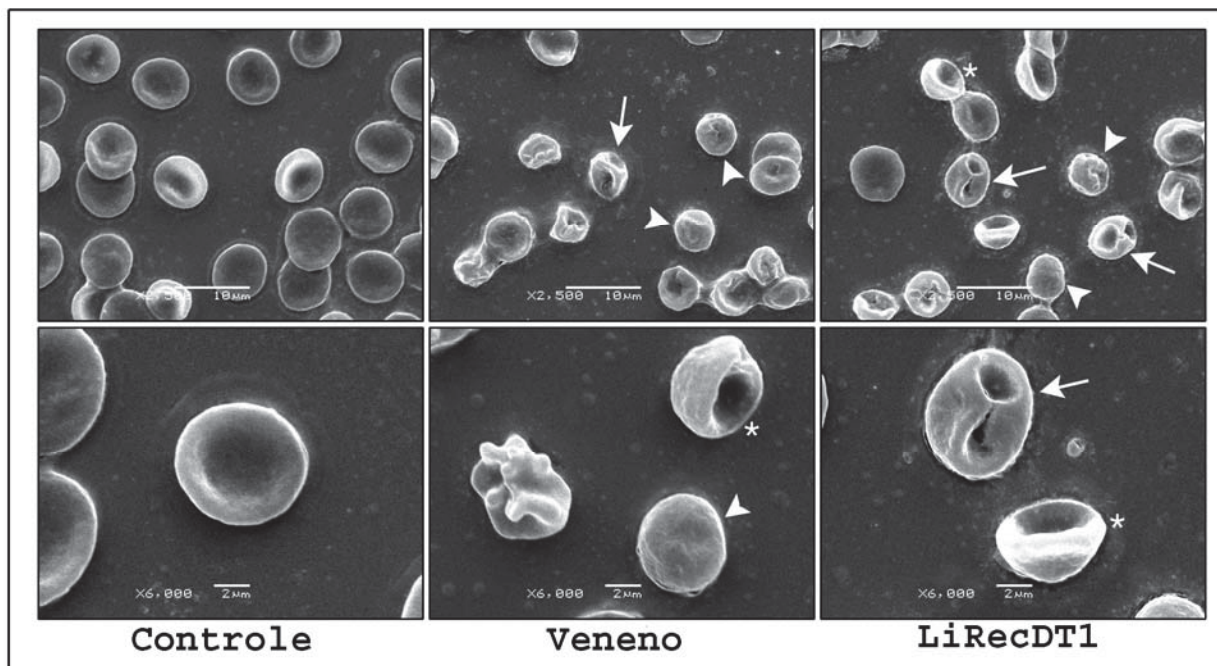


Figura 14: Análise ultra-estrutural dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1. Análise por microscopia eletrônica de varredura. As análises foram realizadas 8h após exposição às toxinas, na concentração de 5μg/mL. Aumento 2.500 e 6.000. As setas indicam knizócitos, os asteriscos indicam estomatócitos e as cabeças de setas indicam esferócitos.

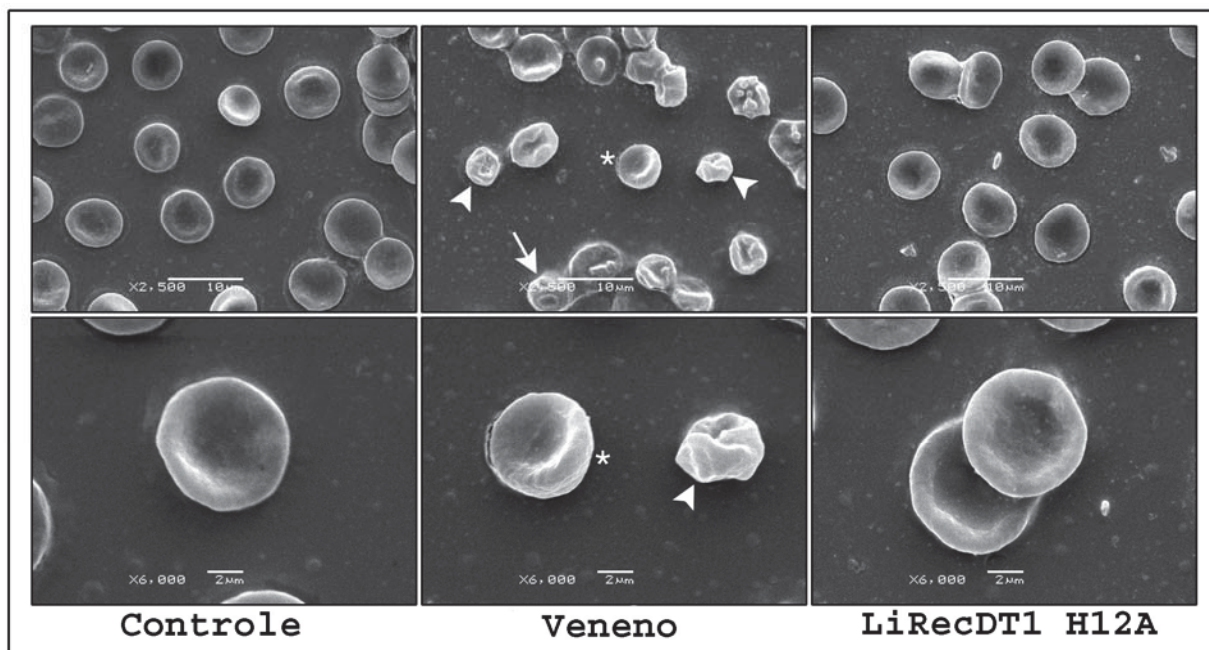


Figura 15: Análise ultra-estrutural dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia* e com a toxina mutada recombinante LiRecDT1 H12A. Análise por microscopia eletrônica de varredura. As análises foram realizadas após 8 horas de exposição às toxinas, na concentração de 5μg/mL. Aumento 2.500 e 6.000. As setas indicam knizócitos, os asteriscos indicam estomatócitos e as cabeças de setas indicam esferócitos.

Por outro lado, modificações na superfície da membrana eritrocitária, como exovesiculação, alterações de tamanho e a presença de microesferócitos, que são muito menores que os eritrócitos normais, foram observados sugerindo que o veneno e a toxina recombinante LiRecDT1 possam estar induzindo um processo de microvesiculação eritrocitária (Figura 16). Todos esses efeitos são decorrentes da atividade enzimática das fosfolipases-D, pois nenhuma alteração semelhante foi observada nos eritrócitos incubados com a toxina recombinante mutada.

Os dados da análise ultraestrutural confirmam os observados na microscopia de luz e as modificações observadas sugerem uma atividade catalítica da fosfolipase-D. As alterações são características de processos hemolíticos, decorrente de alteração na membrana plasmática, podendo estar relacionada com distúrbios na composição dos lipídios de membrana e ou nas proteínas do citoesqueleto adjacente (CHAILLEY *et al.*, 1979; LANGE e SLAYTON 1982; CHUNG, 2007).

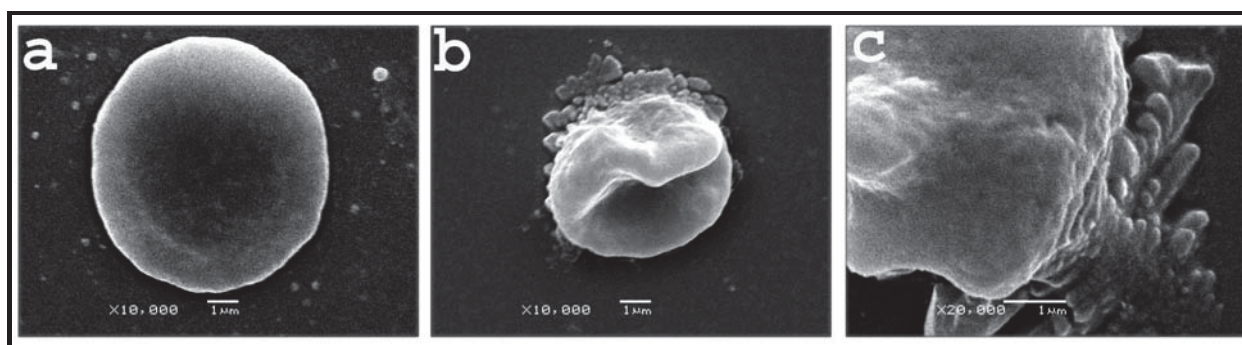


Figura 16: Detalhe da Análise ultra-estrutural dos eritrócitos humanos após tratamento com veneno de *L. intermedia*. Análise por microscopia eletrônica de varredura. As análises foram realizadas após 8h de exposição às toxinas, na concentração de 5 μ g/mL. (a) Controle normal, aumento 10.000. (b) Veneno de *L. intermedia* aumento 10.000. (c) Veneno de *L. intermedia*, detalhe da membrana eritrocitária aumento 20.000.

4.10 Alteração do tamanho eritrócitário

O tamanho celular foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACS-CALIBUR, Becton Dickinson (New Jersey, USA) como preconizado por SHUMILINA *et al.*, 2006. Para isso, utilizou-se inicialmente uma suspensão de 1×10^6 eritrócitos humanos apenas lavados em tampão Ringer, para a aquisição dos parâmetros normais e confeccionar a população padrão. Em seguida, suspensões de eritrócitos humanos, 1×10^6 células, foram incubadas com $25 \mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*, com $25 \mu\text{g/mL}$ de toxina recombinante LiRecDT1 ou LiRecDT1 H12A. As misturas resultantes foram incubadas a 37°C em B.O.D sob agitação delicada e constante. Após 24 horas de incubação, as amostras foram contadas, 100.000 eventos em função do tamanho das células “FSC”. Nos histogramas originados (Figura 17), pode-se observar o tamanho normal dos eritrócitos humanos representados pelo pico homogêneo da população controle, que apresentam cerca de 99% dos eventos contados “Gate M2”. Em contraste, as populações dos eritrócitos tratados com veneno bruto e com a toxina recombinante LiRecDT1 estão modificadas, apresentando redução do tamanho dos eritrócitos e pelo desdobramento dos picos. Podemos observar, também, uma dupla população nos histogramas dos eritrócitos tratados com veneno bruto e com a toxina LiRecDT1. Essa dupla população é caracterizada por uma população de eritrócitos com tamanho normal, representada pelo “Gate M2” (40,03% para o veneno e 51,87% para a LiRecDT1), e uma população com tamanho muito menor, representada pelo “Gate M1” (59,97% para o veneno e 48,13% para a LiRecDT1). Essa população com tamanho reduzido pode ser composta por microesferócitos ou por fragmentos de eritrócitos “debris”.

Já o histograma dos eritrócitos tratados com a toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A não mostrou alteração na população (dado não mostrado). Esse efeito parece ser maior nos eritrócitos tratados com veneno bruto, talvez pela presença de outras enzimas em sua composição. Além disso, sugere também que a redução do tamanho dos eritrócitos é dependente da atividade enzimática das toxinas, já que a toxina mutada não apresentou efeito deletério.

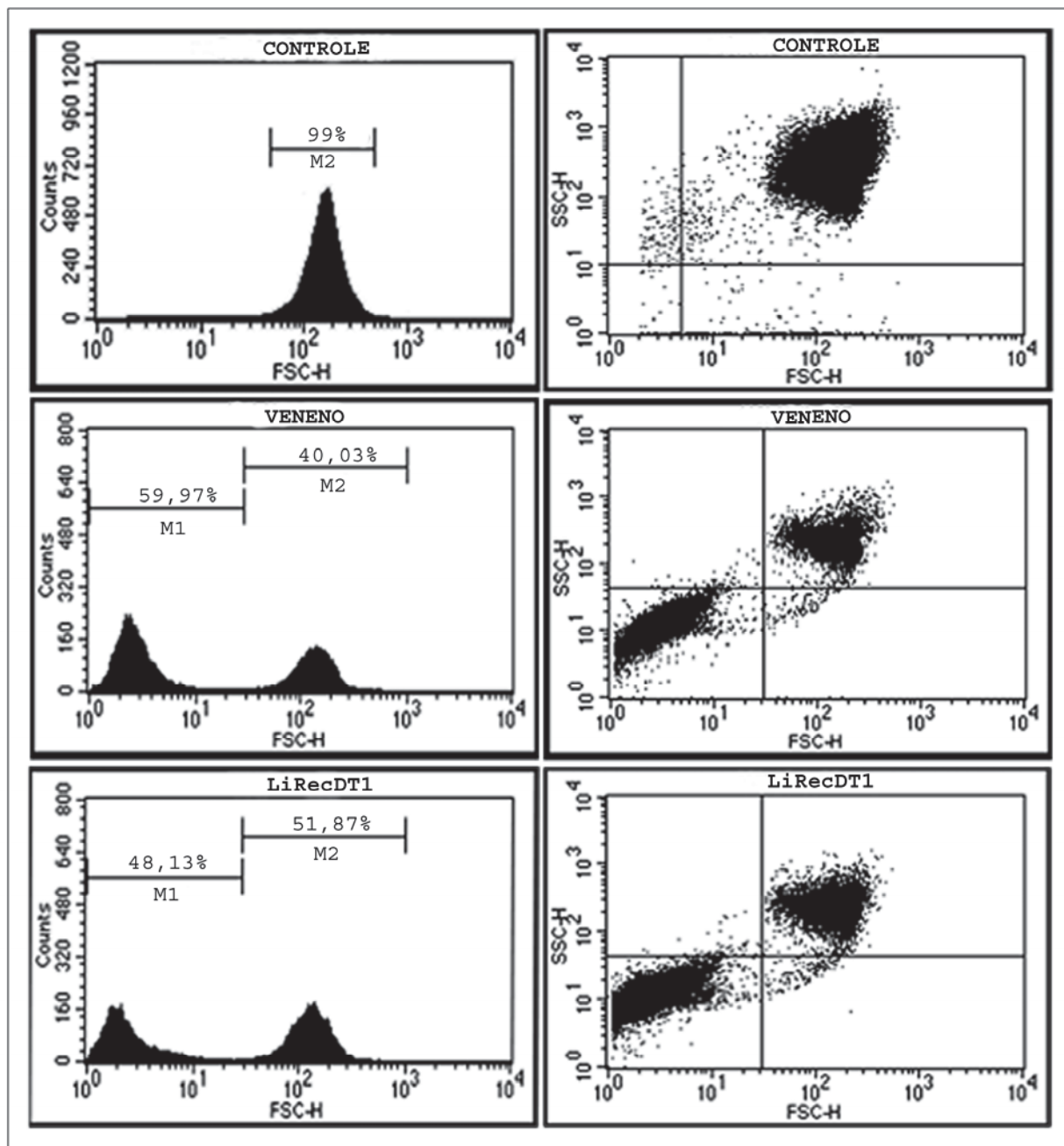


Figura 17: Alteração do tamanho dos eritrócitos tratados com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante LiRecDT1. As amostras de eritrócitos consistiam em 1×10^6 células incubadas com $25 \mu\text{g/mL}$ de toxinas recombinantes LiRecDT1 e $25 \mu\text{g/mL}$ de veneno bruto separadamente, por 24 horas. O “Gate M2” representa eritrócitos com tamanho normal e o “Gate M1” representa eritrócitos com tamanho reduzido ou debris.

4.11 Análise da ligação da LiRecDT1-GFP

A capacidade de ligação da toxina LiRecDT1-GFP foi avaliada por citometria de fluxo, em que eritrócitos humanos lavados (5×10^6 células) foram incubados com $25 \mu\text{g/mL}$ de toxina recombinante fluorescente em Ringer. A presença de fluorescência (canal FL1-H) foi observada, indicando interação da proteína de fusão fluorescente em cerca de 70% dos eritrócitos tratados anteriormente, como ilustrado na Figura 18. As amostras foram avaliadas em triplicata e a autofluorescência (células e tampão) foi utilizada para restringir os valores de fluorescência inespecífica. E para descartar uma possível ligação inespecífica da GFP sobre os eritrócitos, foi realizada a incubação, nas mesmas condições anteriores, com $25 \mu\text{g/mL}$ de GFP purificada. Essa última triplicata não apresentou fluorescência significativa, e seu histograma ficou sobreposto sobre o do controle normal. Descartando a possibilidade da ligação da toxina sobre os eritrócitos, ser decorrente da presença da GFP.

Esse resultado está de acordo com a literatura, pois já foram detectadas interações de várias toxinas diferentes via ensaios de sobreposição de proteína-lipídio. Interações como a observada, são relatadas nos processos fisiológicos e patológicos, incluindo os processos de transdução de sinal mediado por GPCRs e indução de apoptose (DA SILVEIRA *et al.*, 2002). Além disso, acredita-se que a toxina recombinante LiRecDT1, assim como o veneno bruto, apresentem afinidade por lipídios. Isso ficou evidente quando se observou a ligação de ambos sobre esfingomielina, esfingosina-1-fosfato, fosfatidilcolina, liso-fosfatidilcolina e colesterol (CHAIM *et al.*, 2008).

4.12 Ensaios de imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência procedeu-se como KALFA e colaboradores (2006) e VOJTOVÁ e colaboradores (2006), porém com algumas modificações como o descrito no Material e Métodos. Neste ensaio, o objetivo foi confirmar a interação do veneno de *L. intermedia* e das toxinas recombinantes com a membrana eritrocitária. Desse modo, eritrócitos humanos foram lavados e incubados com $25 \mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia* ou com $25 \mu\text{g/mL}$ das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A por $\frac{1}{2}$, 2, 4, 8, 16 e 24 horas em B.O.D à 37°C . Em seguida, foram realizadas as reações utilizando anticorpos policlonais contra o veneno bruto ($\alpha\text{-Vn}$) e contra a toxina recombinante LiRecDT1 ($\alpha\text{-DT1}$) (LUCIANO *et al.*, 2004), ambos produzidos em coelhos. Esses anticorpos foram diluídos em

PBS/BSA e incubados por 2 horas a temperatura ambiente com os eritrócitos humanos tratados. Posteriormente, os eritrócitos foram lavados e incubados com anticorpo secundário anti-coelho (α -IgG de coelho conjugado com FITC) por 60 minutos no escuro.

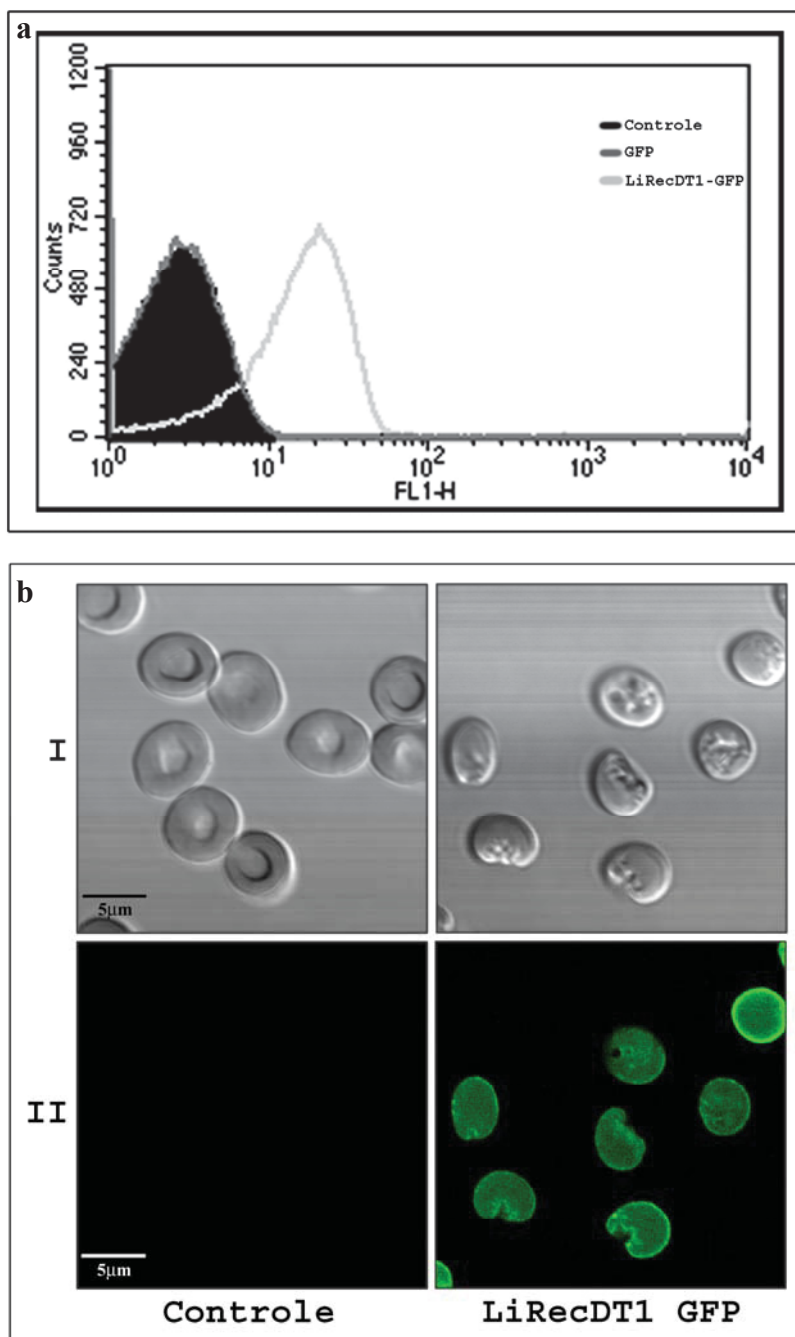


Figura 18: Interação da toxina recombinante LiRecDT1-GFP com eritrócitos humanos. (a) Histograma da ligação da LiRecDT1-GFP sobre eritrócitos, sobreposto sobre o controle e somente GFP. (b) Microscopia Confocal dos eritrócitos tratados com 25µg/mL da LiRecDT1-GFP por 8 horas. Barra de escala mostrada a esquerda.

As lamínas foram, então, montadas sobre poly-L-lisina com Fluormont-G e observadas em microscópio confocal Radiance 2100 (BioRad), acoplado a um microscópio de fluorescência (NIKON ECLIPSE 800). As imagens adquiridas foram processadas como ilustrado nas Figuras 19 e 20.

Os eritrócitos incubados com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinantes LiRecDT1, mostraram intensa reação positiva sobre a superfície celular (Figura 19). Os eritrócitos não tratados e os controles negativos empregados, não demonstraram ligação inespecífica dos anticorpos, certificando a especificidade dos anticorpos empregados. Já a ligação do veneno e das toxinas na membrana eritrocitária demonstrou ligação com um padrão de distribuição homogêneo. Curiosamente, a toxina recombinantes mutada LiRecDT1 H12A, também foi capaz de se ligar à membrana eficientemente, como mostrado na Figura 20, porém não foi capaz de deflagrar alteração morfológica dos eritrócitos. Essa observação sugeriu que a mutação no sítio catalítico da toxina, não interferiu na capacidade de ligação da toxina à membrana. Embora, essa mutação tenha abolido a capacidade da toxina em desencadear os efeitos deletérios observados com o veneno e com a LiRecDT1.

Conseqüentemente, nesse resultado existiram evidências de que o sítio de reconhecimento e ligação da toxina ao eritrócito é independente do sítio catalítico, descartando a possibilidade de influência da atividade catalítica na ligação ao substrato.

4.13 Ensaio para a marcação de microdomínios lipídicos

Este ensaio teve como objetivo investigar se a ligação das toxinas sobre a superfície dos eritrócitos apresentava a capacidade de modificar a organização espacial das regiões especializadas da membrana plasmática, também conhecidas como microdomínios lipídicos, os quais são regiões detergente-insolúveis à 4 °C, ricas em esfingolipídios (esfingomiélna e colesterol) e GM1 (monossialogangliosídeo), que fornecem assimetria à membrana plasmática (LAI, 2003).

Desse modo, eritrócitos recém coletados foram lavados e 1×10^8 células foram incubadas com 25µg/mL de Veneno Bruto e 25µg/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A durante um período de 8 horas. Após o término do período de exposição, foram ressuspensos em 2 mL de Ringer contendo a toxina do cólera “CT-B” conjugado com Alexa Flúor 594 e, em seguida, foi realizada a ligação cruzada com os microdomínios

marcados com CT-B, utilizando o anticorpo anti-CT-B. Foram realizados, também, controles da reação, em que as células permaneceram apenas em Ringer (antes da ligação com CT-B e anticorpo), sendo utilizado como padrão normal de distribuição dos microdomínios. Finalmente, foram montadas as lâminas para visualização dos eritrócitos marcados através de imunofluorescência confocal.

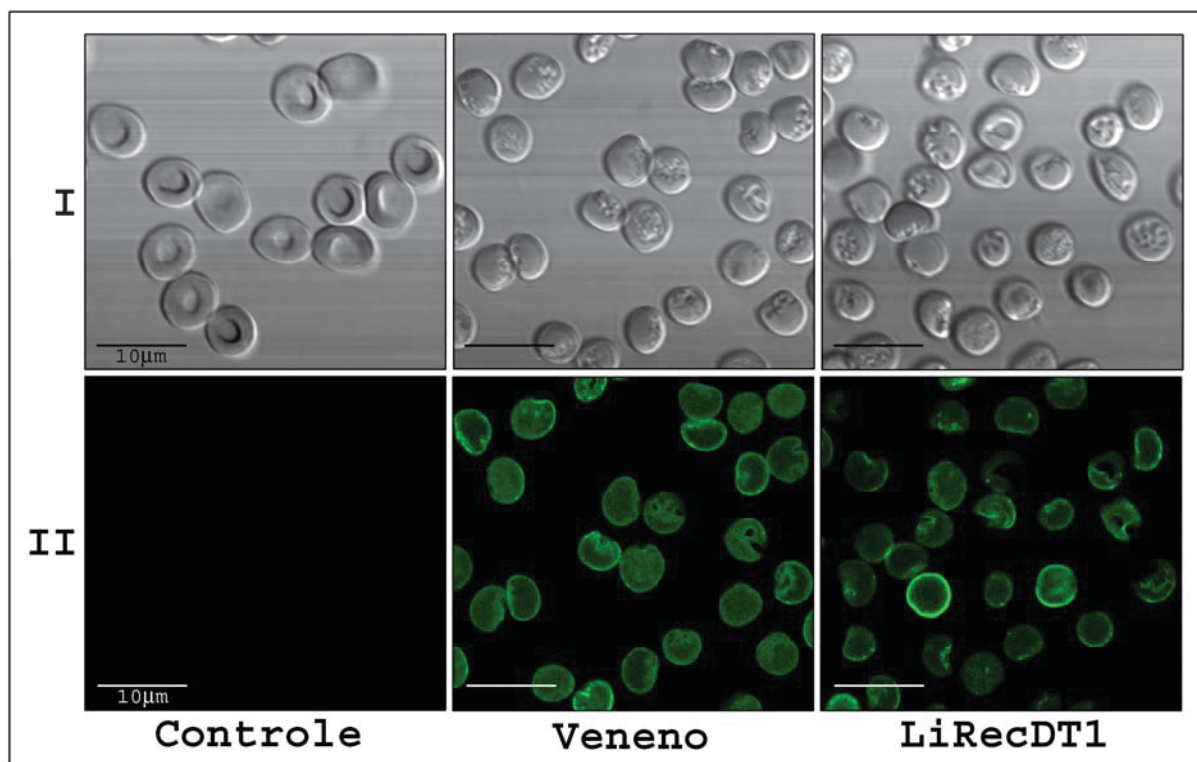


Figura 19: Veneno de *L. intermedia* e toxina recombinante LiRecDT1 ligam-se sobre a superfície dos eritrócitos humanos. Análise por Imunofluorescência associada à Microscopia Confocal com 25µg/mL de toxinas por 8 horas de incubação. Barra de escala é mostrada a esquerda.

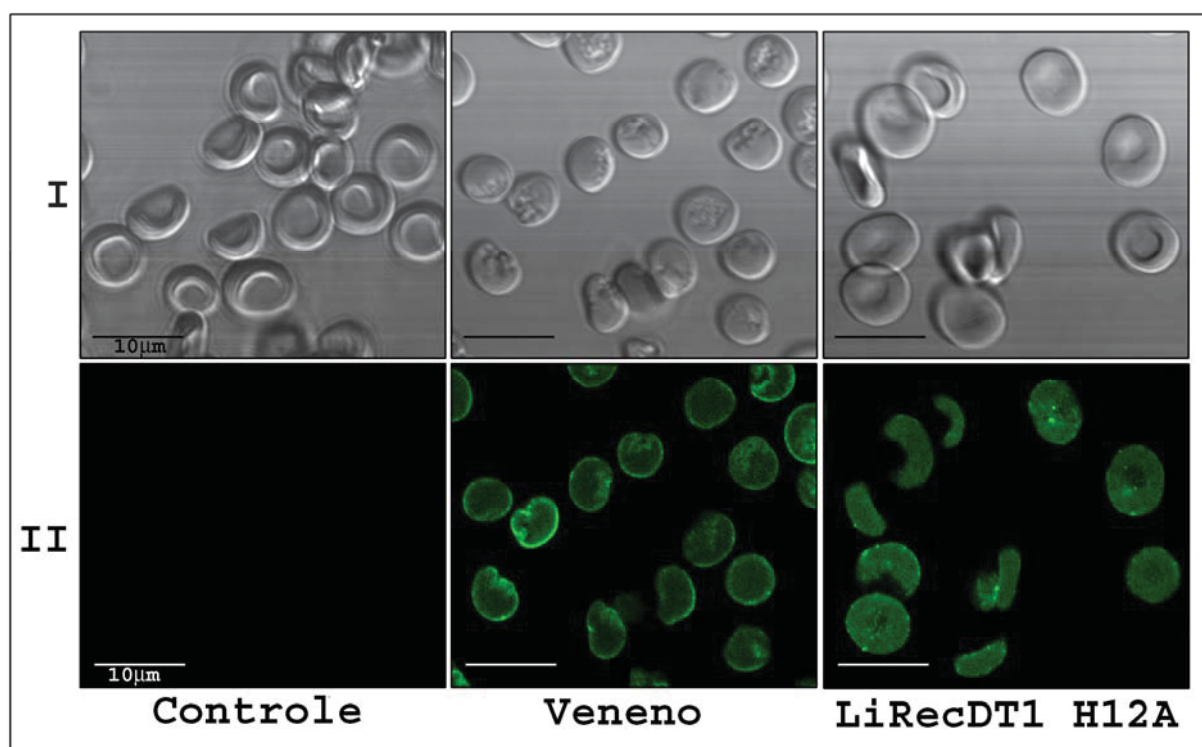


Figura 20: Veneno de *L. intermedia* e toxina mutada recombinante LiRecDT1 H12A ligam-se sobre a superfície dos eritrócitos. Análise por Imunofluorescência associada à Microscopia Confocal com 25 μg/mL de toxinas por 8 horas de incubação. Barra de escala é mostrada à esquerda.

Neste ensaio, foi possível observar o padrão pontilhado típico e homogêneo de distribuição dos *Lipid rafts* sobre os eritrócitos controle (sem toxina), enquanto os eritrócitos expostos ao veneno bruto e à toxina recombinante LiRecDT1 mostraram significativas modificações no perfil de distribuição, sugerindo reorganização dos microdomínios, com a presença de agregados sobre a superfície das células (Figura 21). Por outro lado, nos eritrócitos tratados com a isoforma mutada LiRecDT1 H12A, não foi possível observar qualquer alteração no perfil habitual dos microdomínios, sugerindo que essa reorganização sobre a membrana seja um efeito dependente da atividade fosfolipásica da toxina (dado não mostrado).

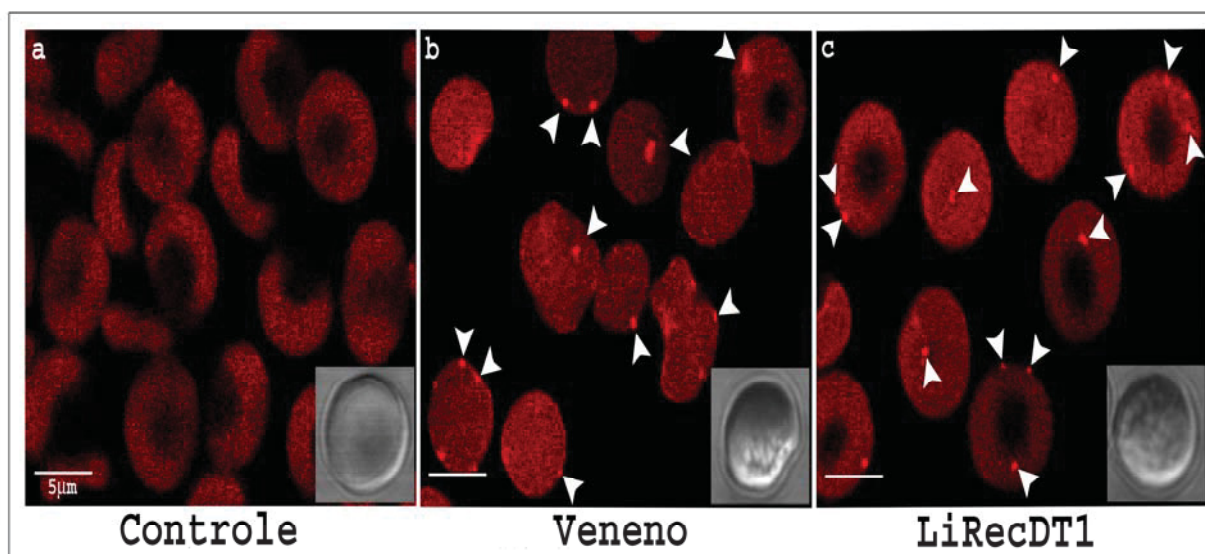


Figura 21: Reorganização dos microdomínios lipídicos dos eritrócitos humanos. Análise por microscopia confocal de eritrócitos expostos ao veneno de *L. intermedia* e à toxina recombinante LiRecDT1. (a) Perfil de distribuição pontilhado típico e homogêneo dos microdomínios lipídicos dos eritrócitos controle. (B) Eritrócitos expostos ao veneno bruto mostrando alterações na organização do perfil dos microdomínios lipídicos. (C) Eritrócitos expostos à toxina recombinante LiRecDT1, também, evidenciam reorganização dos microdomínios lipídicos. Cabeças de setas indicam os agregados sobre a superfície das células. Barra de escala mostrado a esquerda.

4.14 Análise da expressão de fosfatidilserina

O anticoagulante anexina-V é uma proteína com propriedades de ligação com alta afinidade por fosfatidilserina. Em células normais, a fosfatidilserina está localizada apenas na monocamada interna da membrana plasmática, sendo a assimetria da membrana fundamental para a fisiologia normal do eritrócito. Em certos eventos patológicos, existe a externalização de fosfatidilserina, a qual desencadeia efeito pró-coagulante como o observado na anemia falciforme, CIVD e aterosclerose (CHUNG *et al.*, 2007), assim como promove a retirada prematura dos eritrócitos da circulação por eriptose (LANG *et al.*, 2007).

Quando eritrócitos humanos foram incubados com 25µg/mL de veneno de *L. intermedia* e 25µg/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, por 4 horas em Ringer, verificou-se a possibilidade dessas toxinas em causarem a perda da assimetria da membrana dessas células. Após o período de incubação, foram adicionados 5 µl de anexina-V marcada com fluoresceína (FITC) e mensurada a fluorescência celular por citometria de fluxo em 100.000 eventos.

O veneno bruto de *L. intermedia* foi capaz de alterar significativamente a assimetria da membrana dos eritrócitos humanos, como demonstrado na Figura 22, em que 97% das células estavam positivas para a ligação com anexina-V. A toxina recombinante LiRecDT1 também foi capaz de alterar a assimetria da membrana eritrocitária, já que 91% das células também estavam positivas para ligação com anexina-V. Em contraste, a toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A, com redução drástica na atividade fosfolipásica, não ocasionou a externalização de fosfatidilserina nos eritrócitos (Figura 22), apresentando apenas 16% das células positivas para a ligação com anexina-V, sendo próximo ao observado para o controle.

Em resumo, a geração de lipídios bioativos, bem como a alteração da assimetria da membrana plasmática, induzidos pela fosfolipase-D contribui para a idéia da dependência de atividade catalítica da enzima que, por sua vez, sugere a participação da PLD na hemólise observada no acidentes com aranha marrom.

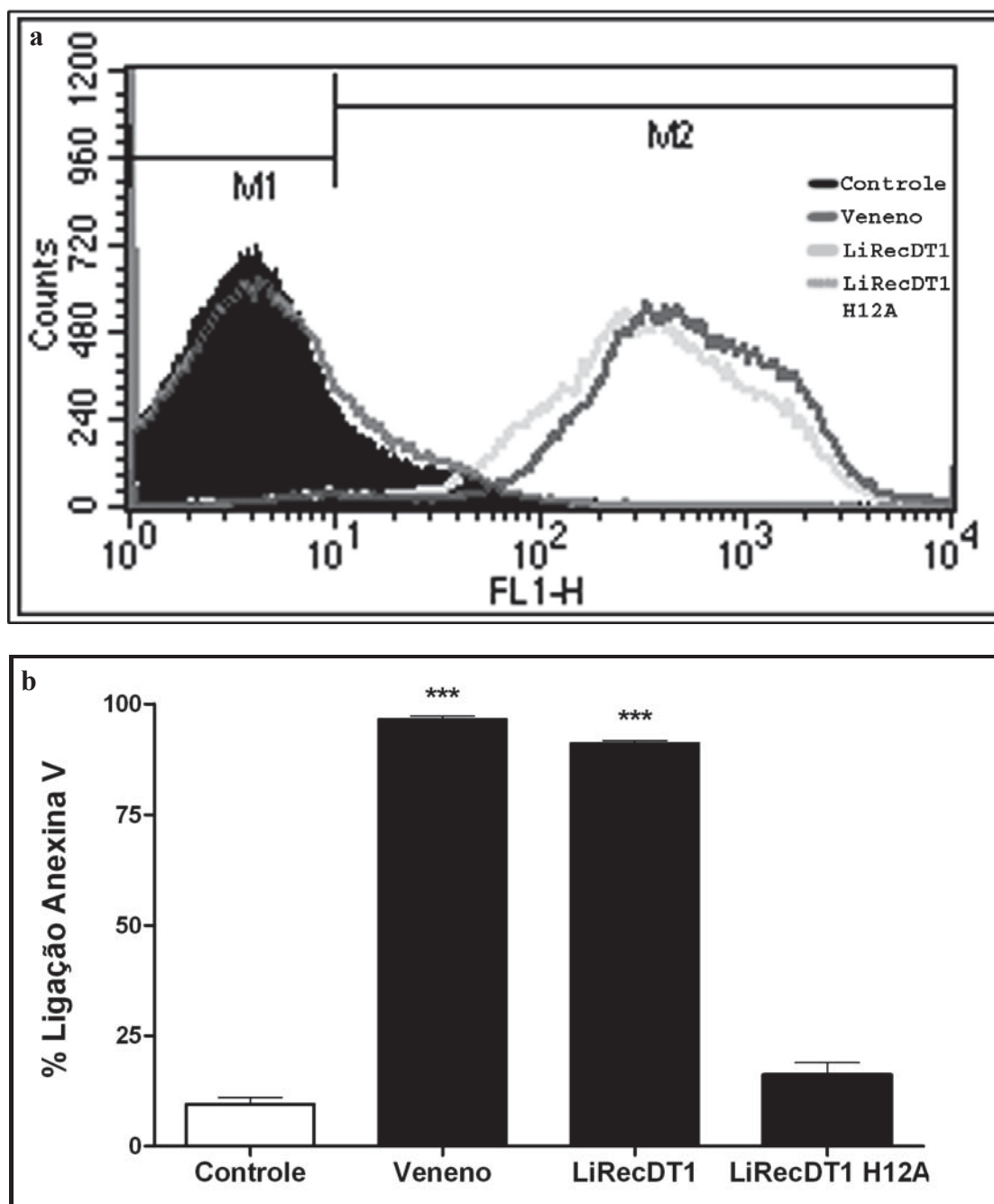


Figura 22: Efeito do veneno de *L. intermedia* e das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A sobre assimetria da membrana eritrocitária. (a) Histograma da ligação de anexina V sobre eritrócitos humanos incubados durante 4 horas com 25µg/mL (veneno bruto ou toxinas recombinantes). (b) Gráfico da porcentagem de externalização de fosfatidilserina sobre os eritrócitos humanos \pm SEM (n=5). Os asteriscos indicam a significância (***) diferença em relação ao controle.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, o aumento do número de notificações de acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* tornou-se uma preocupação em algumas regiões do Brasil, particularmente na área de Curitiba e região metropolitana. Apesar de existir, atualmente, uma série de informações biológicas e epidemiológicas que facilitam o diagnóstico dos acidentes loxoscélicos, muitos aspectos fisiopatológicos da ação do veneno loxoscélico permanecem pouco estudados, desconhecendo-se a importância e a participação de determinados sistemas e tipos celulares na patogênese do loxoscelismo. Os avanços em biologia molecular têm com a produção de toxinas recombinantes, permitido estudar as proteínas de venenos isoladamente. A clonagem e expressão destas proteínas heterólogas possibilitaram a avaliação individualizada de proteínas que apresentam atividades sinérgicas e compõem a mistura protéica que forma os venenos das aranhas.

Os eventos patológicos observados nos casos de envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* já foram bastante estudados, porém os mecanismos moleculares exatos pelos quais o veneno exerce seus efeitos tóxicos ainda permanecem obscuros e sob constante investigação científica. Diversas proteínas presentes nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* já foram descritas e estudadas, porém, somente a toxina dermonecrótica (esfingomielinase-D/fosfolipase-D) é capaz de reproduzir, isoladamente, as lesões dermonecróticas induzidas pelo veneno bruto. Sem dúvida, esta classe de toxinas é, por sua importância biológica, a toxina mais estudada e bem caracterizada no veneno. Bioquimicamente, as toxinas dermonecróticas são classificadas como fosfolipases-D (PLD), capazes de hidrolisar lisoglicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios gerando ácido lisofosfatídico (LPA) e ceramida-1-fosfato (C1P) (LEE e LYNCH, 2005). Na busca pelo melhor entendimento do Loxoscelismo, nosso trabalho visou à avaliação da atividade biológica de toxinas dermonecróticas recombinantes e a relação desta atividade com os efeitos deletérios provocados pelo veneno de *Loxosceles intermedia* no acidente com as aranhas.

A atividade hemolítica do veneno de *L. intermedia*, bem como a participação das toxinas fosfolipases-D no evento de lise eritrocitária permanecia pouco compreendida. Os dados disponíveis eram escassos e, muitas vezes, contraditórios, o que tornava necessário o estudo mais aprofundado e detalhado do assunto no intuito de esclarecer o mecanismo pelo qual o veneno provoca hemólise intravascular. Apesar de o loxoscelismo sistêmico ocorrer na minoria dos acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*, a lise eritrocitária provocada é

especialmente relevante considerando que esta é a reação sistêmica mais séria dentro do quadro clínico. Por isso tudo surgiu o interesse em avaliar a existência de atividade hemolítica direta (independente de complemento, isto é, livre de soro) do veneno de *Loxosceles intermedia* e quais seriam os possíveis mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Uma outra curiosidade era a respeito da atividade enzimática das fosfolipases-D, se esta era essencial para os efeitos hematológicos observados no quadro loxoscélico. Os resultados obtidos com o veneno de *L. intermedia* e com a toxina LiRecDT1 no ensaio de atividade hemolítica *in vitro* (Gráfico 4) evidenciam a participação da toxina dermonecrótica no efeito sobre os eritrócitos, sugerindo que esta classe de toxinas seria a grande responsável pelo efeito de lise celular observado nas nossas condições experimentais.

A participação do complemento tem sido relacionada com a hemólise induzida pelo veneno de *Loxosceles*. Estudos indicam que o envenenamento induz a ativação da via alternativa do complemento facilitando a hemólise mediada pelo complemento (FUTRELL, 1992; BRAVO *et al.*, 1993; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006). Contudo nossos resultados que indicam uma ação hemolítica direta do veneno de *L. intermedia* e das toxinas dermonecróticas não descaracterizam a participação do complemento no evento hemolítico provocado pelo veneno já descrito. Na verdade, nossos dados sugerem que a atividade hemolítica direta das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* juntamente a hemólise dependente de complemento atuam em sinergismo no evento hemolítico que segue os acidentes com aranhas de gênero *Loxosceles*.

A utilização da toxina mutada LiRecDT1 H12A, que apresenta redução drástica da atividade catalítica de fosfolipase-D e redução na capacidade de desenvolver dermonecrose em pele de coelhos, porém permanecendo com a sua capacidade de ligação à esfingomielina, ao colesterol e a alguns liso esfingolipídeos (CHAIM *et al.*, 2008) permitiu uma avaliação da participação do domínio catalítico na atividade hemolítica. Os resultados obtidos com a utilização desta toxina recombinante sugerem que a atividade fosfolipásica está fortemente relacionada ao efeito hemolítico direto provocado pelo veneno de *L. intermedia*.

Outro ponto importante, vinculado à atividade lítica dessas toxinas, refere-se ao magnésio (Mg^{+2}) presente no sítio ativo. Nossos estudos confirmam dados anteriores que afirmavam que este íon desempenha papel-chave na coordenação e estabilização do grupo fosfato da esfingomielina durante a hidrólise, sendo bastante conservado entre espécies de aranha marrom (MURAKAMI *et al.*, 2006). Obtivemos uma inibição praticamente total do efeito hemolítico com a utilização de EDTA, sendo equivalente ao controle negativo (sem

toxina). Relacionamos estes dados experimentais à alta afinidade do EDTA por íons Mg^{+2} , sugerindo que ocorra o seqüestro deste íon do sítio catalítico da enzima. A ausência do Mg^{+2} promove a perda da atividade catalítica da enzima, justificando a inibição do efeito hemolítico. Logo, que o magnésio é essencial para estabilizar o grupo fosfato dos fosfolipídios durante a hidrólise e sua ausência resulta em perda da atividade enzimática das PLD.

Nossos dados mostram que os Sistemas ABO e Rh não interferem na atividade hemolítica direta da LiRecDT1. Esses dados descartam a possibilidade de os Sistemas ABO ou Rh pudessem predispor os eritrócitos a uma ação hemolítica maior, através de interação eletrostática com as enzimas do veneno.

Os experimentos que avaliaram a atividade da LiRecDT1 sobre eritrócitos de diferentes mamíferos sugerem o envolvimento de determinados esfingolipídeos no processo hemolítico desencadeado. Os eritrócitos mais susceptíveis a ação da toxina recombinante foram os que apresentavam maior quantidade de esfingomiélinea em suas membranas. Esses dados sugerem a participação do metabolismo da esfingomiélinea nos efeitos deletérios provocados pelo veneno de *L. intermedia* nos eritrócitos. Estes resultados associam o efeito hemolítico à ação das toxinas dermonecroticas, uma vez que estas toxinas são bioquimicamente classificadas como fosfolipases-D (PLD), devido a sua capacidade de hidrolisar lisoglicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios, que incluem a esfingomiélinea (LEE e LYNCH, 2005). Recentemente, a ativação do metabolismo da esfingomiélinea, demonstrou desempenhar um papel importante em diversos processos biológicos, como cascatas de transdução de sinal envolvidas na proliferação celular, diferenciação e apoptose (OCHI *et al.*, 2004; EYSTER, 2007, MACEYKA, MILSTIEN e SPIEGEL, 2005; GÓMEZ-MUÑOZ, 2006; GANGOITI *et al.*, 2008).

As análises morfológicas por microscopia de luz dos eritrócitos confirmaram nossos resultados que indicavam a ação direta do veneno e da toxina LiRecDT1 sobre essas células. As imagens obtidas sugerem que o diâmetro do eritrócito tratado seria menor que o do discócito, dados corroborados pela citometria de fluxo. Avaliações das características morfológicas através de citometria de fluxo mostraram alterações da forma normal dos eritrócitos, estes dados forneceram resultados mais quantitativos e representativos da ação do veneno e das toxinas sobre os eritrócitos. A microscopia eletrônica de varredura além de permitir a descrição e a distinção entre células espiculadas como acantócitos e esquizócitos, possibilitou a observação de células semelhantes à estomatócitos e esferócitos. A ausência de

alterações nas células tratadas com LiRecDT1 H12A confirma a necessidade da atividade catalítica das toxinas dermonecroticas para a ação tóxica sobre eritrócitos. Como discutido anteriormente, nosso grupo mostrou que esta toxina mutada mantém a capacidade de ligação com moléculas da membrana eritrocitária (CHAIM *et al.*, 2008), portanto, as imagens aqui observadas sugerem que apenas a ligação das toxinas do tipo PLD à membrana eritrocitária não é suficientemente capaz de desencadear nenhum efeito sobre morfologia dos eritrócitos. Acreditamos que os metabólitos da ação da PLD loxoscélica sobre a membrana eritrocitária desempenham papel chave na atividade hemolítica direta do veneno de *L. intermedia*. Clinicamente, alterações nos componentes da membrana, lipídeos ou proteínas, podem resultar em mudanças na forma com conseqüente diminuição da resistência aos insultos metabólicos e mecânicos que estas células sofrem constantemente na circulação e aumento da destruição destas células (anemia hemolítica) (HASSOUN e PALEK, 1996).

Como discutido anteriormente, a ativação do metabolismo da esfingomielina desempenha um papel importante em diversos processos fisiopatológicos (OCHI *et al.*, 2004; EYSTER, 2007). E isto ocorreria, principalmente, através da ação dos seus metabólitos a ceramida e a esfingosina-1-fosfato (S1P) (HANEL, ANDRÉANI, e GRALER, 2007). A geração de ceramida é mediada pela hidrólise de esfingomielina, esta ceramida é deaminada à esfingosina por uma ceramidase e a esfingosina é fosforilada à esfingosina-1-fosfato (S1P) por uma esfingosina quinase, a ceramida inicialmente produzida também pode ser convertida em ceramida-1-fosfato pela ceramida quinase (CHALFANT e SPIEGEL, 2005; EYSTER, 2007; ODA *et al.*, 2008). Todos os metabólitos acima descritos já foram relacionados com sinalização celular nos mais diversos processos biológicos, tanto fisiológicos quanto patológicos (MACEYKA *et al.*, 2005; GÓMEZ-MUÑOZ, 2006; GANGOITI *et al.*, 2008). Experimentos *in vitro* mostraram que as fosfolipases-D (PLD) loxoscélicas são capazes de hidrolisar lisoglicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios gerando ácido lisofosfatídico (LPA) e ceramida-1-fosfato (C1P) (LEE e LYNCH, 2005). A ceramida-1-fosfato está envolvida em diversas respostas patológicas que incluem inflamação e agregação plaquetária (ANLIKER *et al.*, 2004; LEE e LYNCH, 2005), além de ser descrita como um segundo mensageiro na apoptose (PUSHKAREVA, OBEID e HANNUN, 1995; GOÑI e ALONSO, 2002). A geração do ácido lisofosfatídico (LPA) pelas PLDs loxoscélicas (van MEETEREN *et al.*, 2004; LEE e LYNCH, 2005) seria capaz de induzir diversas respostas biológicas pela sua ligação a receptores associados à proteína G (ANLIKER e CHUN, 2004). Recentemente, verificou-se que a PLD hidrolisa a lisofosfatidilcolina ou LPC (1-*o*-hexadecilglicero-3-

fosfocolina), um importante componente plasmático, resultando neste importante mediador lipídico, o LPA (van MEETEREN *et al.*, 2004; LEE e LYNCH, 2005). Sugerindo a participação do LPA proveniente da lise de LPC no quadro do envenenamento loxoscélico.

A análise ultraestrutural permitiu visualizar diversas alterações morfológicas, incluindo o a presença de microvesiculação na membrana dos eritrócitos tratados com veneno bruto e LiRecDT1. Este perfil de diminuição do volume celular e exovesiculação é uma característica observada quando o eritrócito sofre certos tipos injúria celular e exposição ao LPA (LANG *et al.*, 2005 e CHUNG *et al.*, 2007). Essas alterações morfológicas já foram observadas após o tratamento de eritrócitos com várias concentrações de LPA (CHUNG *et al.*, 2007). Segundo esse mesmo autor o tratamento com LPA induz o influxo de cálcio para dentro dos eritrócitos e esse é um mecanismo comum para microvesiculação e externalização de fosfatidilserina (PS). Esse fenômeno, então, acarreta a formação de micro-partículas com PS expostas, aumentando a coagulação do sangue e a aderência à célula endotelial. Essa atividade trombogênica já foi observada em casos de coagulação intravascular disseminada (CIVD) e Anemia Falciforme (CHUNG *et al.*, 2007).

Analisando estes dados podemos sugerir a participação do LPA, como metabólito da ação do veneno de *L. intermedia* sobre a membrana eritrocitária, no processo hemolítico direto provocado pelas toxinas PLD. Neste sentido, foi importante verificar a capacidade do tratamento com o veneno/LiRecDT1, que foi capaz de alterar a assimetria da membrana eritrocitária, evento que segue a ação do LPA sobre estas células.

Como discutido anteriormente LPA e S1P são conhecidos como indutores de várias respostas patológicas, incluindo inflamação e agregação plaquetária, aumento da permeabilidade vascular e da infiltração de neutrófilos (ANLIKER e CHUN, 2004; van MEETEREN *et al.*, 2004 LEE e LYNCH, 2005;). Portanto, os dados até o momento obtidos sugerem um possível mecanismo de ação para o efeito hemolítico direto do veneno de *L. intermedia*: através da geração de mediadores lipídicos sobre a superfície dos eritrócitos, as fosfolipases-D presentes no veneno estimulariam danos na membrana destas células tornando-as mais propícias ao estresse fisiológico, induzindo à hemólise. Ou ainda, estes mediadores lipídicos poderiam desencadear uma sinalização intracelular que resultaria na lise celular.

Este mecanismo de hemólise sugerido, resultante da hidrólise da esfingomielina, é bastante similar ao processo fisiológico em que uma esfingomielinase neutra endógena é ativada e desencadeia um processo apoptótico, isto já foi observado para diferentes células incluindo os eritrócitos (RAINES *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1997; BIRBES *et al.*, 2001;

LANG, 2005). O metabolismo da esfingomielina originando ceramida poderia alterar as propriedades celulares globais, como por exemplo, alterações nos *Lipid rafts* e na fluidez da membrana desencadeando processos intracelulares (HUWILER *et al.*, 2000). Os metabólitos da esfingomielina gerados pela ação de toxinas poderiam atuar em receptores da membrana do próprio eritrócito desencadeando uma sinalização intracelular, que culminaria no evento hemolítico.

Além disso, nossos resultados sugerem que apenas a ligação das toxinas à membrana celular não é suficiente para desencadear os efeitos tóxicos sobre os eritrócitos, existindo a necessidade da atividade do sítio catalítico destas enzimas, uma vez que a toxina mutada LiRecDT1 H12A, apesar não apresentar atividade catalítica é capaz de se ligar a diferentes lipídios da membrana (colesterol, esfingomielina, liso esfingolipídios) (CHAIM *et al.*, 2008). Portanto, a toxina LiRecDT1 H12A interage com a membrana do eritrócito sem ser capaz de induzir a hemólise.

O mecanismo de ação de uma fosfolipase-C, a α -toxina de *Clostridium perfringens* que induz hemólise em eritrócitos de carneiro e coelho sendo esta atividade relacionada com a ativação do metabolismo da esfingomielina, especialmente com a formação de SIP (esfingosina-1-fosfato) já foi extensivamente estudada. Sabe-se que a atividade esfingomielinásica desta toxina é essencial para seu efeito hemolítico e, portanto, eritrócitos com maior proporção de esfingomielina na membrana apresentam maior taxa de hemólise (SAKURAI *et al.*, 1994); (OCHI *et al.*, 2004). Avaliação sobre o mecanismo molecular pelo qual esta fosfolipase-C desencadeia o efeito hemolítico, já foi realizada e indica que está relacionada com o metabolismo da esfingomielina, especialmente através da geração de SIP (OCHI *et al.*, 2004); mas estudos recentes mostram a participação de uma esfingomielinase endógena no seu efeito hemolítico (ODA *et al.*, 2008). Apesar de nossos estudos envolverem outra classe de fosfolipase, que diferem das fosfolipases-C no ponto de clivagem da esfingomielina e nos produtos primários resultantes, este possível mecanismo também deve ser investigado, pois os produtos finais resultantes da ação destas enzimas têm sido reportados como os mesmos (LPA e SIP). E considerando esta possibilidade, poderíamos ter a participação de uma esfingomielinase endógena, atuando sinergicamente à PLD loxoscélica, no evento hemolítico desencadeado pelo veneno de *L. intermedia*.

Os resultados até o momento obtidos indicam fortemente que a fosfolipase-D interage especificamente com lipídios de membrana, especialmente com a esfingomielina. Porém, existem muitos pontos a serem esclarecidos sobre a atuação do veneno de *L. intermedia* e das

toxinas dermonecróticas sobre os eritrócitos e no mecanismo do evento hemolítico, como a participação dos metabólitos da esfingomiéline gerados pela ação das PLDs no desencadeamento dos processos celulares que irão gerar a hemólise.

Finalmente, consideramos que este estudo foi de grande relevância científica, pois acreditamos que essas informações continuarão abrindo novas hipóteses, que são essenciais para o aprofundamento no conhecimento do loxoscelismo, bem como para os nossos trabalhos futuros. Nosso objetivo maior é buscar esclarecer os mecanismos moleculares da atividade hemolítica direta do veneno de *Loxosceles intermedia*, trazendo dados que possam ser úteis não só para o diagnóstico e tratamento dos acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*, mas também possam evidenciar possíveis aplicações biotecnológicas para as toxinas recombinantes produzidas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- ✓ O veneno de *L. intermedia* é suficientemente capaz de desencadear hemólise direta de eritrócitos humanos “*in vitro*”;
- ✓ A fosfolipase-D recombinante, chamada LiRecDT1, também é capaz de desencadear hemólise direta de eritrócitos humanos, demonstrando ser a responsável pela atividade hemolítica do veneno de *L. intermedia*;
- ✓ Agentes quelantes de íons divalentes como EGTA, EDTA e 1,10-Fenantrolina são capazes de inibir eficientemente a atividade hemolítica da fosfolipase-D “LiRecDT1”, já o inibidor de serino-protease PMSF não é capaz;
- ✓ Os sistemas ABO e Rh não influenciam na atividade hemolítica da toxina recombinante LiRecDT1 sobre eritrócitos humanos;
- ✓ Eritrócitos de carneiro, coelho e humano apresentam maior susceptibilidade à fosfolipase-D recombinante “LiRecDT1”, do que eritrócitos de cavalo;
- ✓ O veneno de *L. intermedia* e a fosfolipase-D recombinantes LiRecDT1 são capazes de deflagrar alterações morfológicas nos eritrócitos humanos;
- ✓ A técnica de citometria de fluxo evidenciou redução do tamanho dos eritrócitos humanos expostos ao veneno de *L. intermedia* e à toxina recombinante LiRecDT1;
- ✓ Ensaio de imunofluorescência mostrou ligação do veneno de *L. intermedia* e da fosfolipase-D sobre eritrócitos humanos;
- ✓ Observou-se reorganização e agregação dos microdomínios lipídicos da membrana dos eritrócitos incubados com veneno de *L. intermedia* e a fosfolipase-D recombinante LiRecDT1;

- ✓ Houve perda da assimetria da membrana eritrocitária, por exposição de fosfatidilserina dos eritrócitos incubados com veneno de *L. intermedia* e com a toxina recombinante LiRecDT1;

- ✓ Utilizando-se uma toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A, com redução drástica da atividade fosfolipásica, mostrou-se o envolvimento da atividade catalítica da fosfolipase-D no efeito hemolítico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANLIKER, B.; CHUN, J. Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors, **J. Biol. Chem.** 279: 20555–20558, 2004.
- ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon.** 37:627-632, 1999.
- ANDRADE, S.A.; PEDROSA, M.F.F.; ANDRADE R.M.G.; OLIVA, M.L.V.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Conformational changes of *L.* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 327: 117-123, 2005.
- ANDRADE, S. A; MURAKAMI, M.T; CAVALCANTE D. P; ARNI, R. K; TAMBOURGI, D. V. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases-D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon.** 47:380–386, 2006.
- AMARANTES-MENDES, G.; KIM, C.N.; LIU, L.; HUANG, Y.; PERKINS, C.L.; GREEN, BHALLA, K.D.R. Bcr-abl exerts its effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome c and activation of caspase 3. **Blood.** 1700-1705, 1998.
- APPEL, M. H; DA SILVEIRA, R. B; CHAIM, O. M; SILVA, D. T; CHAVES - MOREIRA, D; DA SILVA, P. H; PALUDO, K. S; MANGILI, O. C; SENFF-RIBEIRO, A; GREMSKI, NADER, W; H. B; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, **Biochim. Biophys. Acta.** 1780: 167–178, 2008.
- ATKINSON P. NEWLANDS G. A key for the clinical diagnosis of araneism in Africa south of the equator. **S. Afr. Med. J.** 20: 77. 96-7, 1990.

- BABCOCK, J.L.; CIVELLO, D.J.; GEREN, C.R. Purification and characterization of a toxin from brown recluse spider (*L. reclusa*) venom gland extracts. **Toxicon**. 19:677-689, 1981.
- BABCOCK, J.L.; MARMER, D.J.; STEELE, R.W. Immunotoxicology of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom. **Toxicon**. 24: 783-790, 1986.
- BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *L. gaucho* spider venom. **Toxicon**. 30:331-338, 1992.
- BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *L. gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**.32:687-693, 1994.
- BARBARO, K.C.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz J. Med. Biol. Res.** 29: 1491-1497, 1996.
- BARRETO, O.C.O.; CARDOSO, J.L.C.; De CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 27: 264-267, 1985.
- BARRETTO, A.S.O.C. DE O.; PRESTES, K.S.; FONSECA, L.K.F.; AUGUSTO, P. Functional alterations of rabbit erythrocytes induced by *Loxosceles gaucho* venom. **Hum Exp Toxicol**. 26: 817, 2007.
- BARON, G.S.; WEHRLY, K.; DORWARD, D.W.; CHESEBRO, B.; CAUGHEY, B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. **Embo J**. 21:1031-40, 2002.
- BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLIER, B. S.; KIPPS, T. J. K. **Hematology**. 5 ed. p. L-51. New York: Mc Graw-Hill, 1995.

BIRBES, H.; EL BAWAB, S.; HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M.; Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. **FASEB J.** 15: 2669-2679, 2001.

BRADFORD, M.M.A. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Bonding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

BRAVO, L. M.; PURATIC, S.O.; BEHN, T.C.; FARDELLA, B.C.; CONTREPA, F.A. Estudio de la hemólisis inducida por veneno de *L. laeta*. Experiência *in vitro*. **Rev. Med. Chile.** 121: 16-20,1993.

BRATOSIN, D; ESTAQUIER,J; PETIT, F; ARNOULT, D; QUATANNENS, B; TISSIER, J-P; SLOMIANNY, C; SARTIAUX, C; ALONSO, C; HUART, J-J; MONTREUIL, J; AMEISEN, J.C. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. **Cell Death Differ.** 8: 1143-1156, 2001.

BOGDAN, S.; BARABAS, J.; ZACHER, G.; HUSZAR, T.; VELICH, N.; SZABO, G.; NEMETH, Z. Total upper lip necrosis and Loxoscelismo caused by violin spider bite. **Orv. Hetil.** 146: 45. 2317-21, 2005.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F. O.; EICKSTEDT, V. D.; BORGES, I.; NOGUEIRA, M. T. Loxoscelismo: estudo de 242 casos (1980-1984). **SBTox.** 1: 58-60, 1988.

CARDOSO, J. L. C.; DE CILLO, D. M. Primeiro diagnóstico de “loxoscelismo” na casuística do Hospital Vital Brazil (HVB). **Mem Inst Butantan.** 52(supl.): 81, 1990.

CARDOSO, FC.; PACIFICO, L.G; CARVALHO, D.C.; VICTORIA, J.M.; NEVES, A.L.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and characterization of *Phoneutria nigriventer* toxins active on calcium channels. **Toxicon.** 41: 755-763, 2003.

CHAILLEY, B.; WEED, R.I.; LEBLOND, P.F.; MAIGNÉ, J. Formes échinocytaires et stomatocytaires du globule rouge. **Nou. Rev. Fr. Hématol.** 13:71-88, 1973.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; DA SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 211:64-77, 2006.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; SILVA, D.T.; FERRER, V.P.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Mechanistic relationship of phospholipase activity and toxicity of dermonecrotic toxin from brown spider venom. **J Biol Chem.** 2008 (submitted article)

CHALFANT, C.E.; SPIEGEL, S. Sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate: expanding roles in cell signaling. **J Cell Sci.** 118: 4605-4612, 2005.

CHU, J.Y.; RUSH, C.T.; O'CONNOR, D.M.; Hemolytic anemia following brown spider (*Loxosceles reclusa*) bite. **Clin Toxicol.** 12:531-4, 1978.

CHUNG, S.M.; BAE, O.N.; LIM, K.M.; NOH, J.Y.; LEE, M.Y.; JUNG, Y.S.; CHUNG, J.H. Lysophosphatidic Acid Induces Thrombogenic Activity Through Phosphatidylserine Exposure and Procoagulant Microvesicle Generation in Human Erythrocytes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27: 414 - 421, 2007.

CUNHA, R.B.; BARBARO, K.C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F.C.; FONTES, W.; DE SOUSA, M.V. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *L. gaucho* brown spider venom. **J. Protein Chem.** 22: 135-146, 2003.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Escorpionismo. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; FAN, F.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, Jr. V, eds. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** Sarvier, São Paulo, p.182-197, 2003.

DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**. 44: 693-709, 2004.

DA SILVEIRA, R.B.; FILHO, J.F.S.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**. 40: 815-822, 2002.

DA SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; TOMA, J.L.DL.; 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**. 88: 9. 1241-1253, 2006.

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

DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**. 49: 758-768, 2007b.

DA SILVEIRA, R.B.; WILLE, A.C.M; CHAIM, O.M.; APPELL, 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 astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem. J.** 406: 1042-1051, 2007c.

DENNY, W.F.; DILLAHA, C.J.; MORGAN, P.N. Hemotoxic effector *L. reclusa* venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **J. Lab.Clin. Med.** 64:291, 1964.

DESAI A., LANKFORD H.A., WARREN J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. **Inflammation**. 24: 1-9, 2000.

DOS SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; VIGGIANO, R. L. L.; DA SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O.C; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**. 38:265-285, 2000.

DYACHENKO, P.; ZIU, M.; ROZENMAN, D. Epidemiological and clinical manifestations of patients hospitalized with brown recluse spider bite. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol**. 20: 9. 1121-1125, 2006.

ESCOUBAS, P. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**. 82: 893-907, 2000.

EYSTER, K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. **Advan Physiol Educ**. 31:5-16, 2007.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*L. intermedia*) venom. **Toxicon**. 36: 1039-1051, 1998.

FISCHER, M. L. **Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae), no Município de Curitiba, PR**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1996.

FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D. **Arch Biochem Biophys**. 187:355-65, 1978.

- FOSTER, L.J.; DE HOOG, C.L.; MANN, M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. **Proc Natl Acad Sci.** 100: 10. 5813-8, 2003.
- FURLANETTO, R. S. **Estudos sobre a preparação do soro anti-loxoscélico.** Tese de Livre Docência - Faculdade Farmácia e Odontologia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1961.
- FUTRELL, J.M.; MORGAN, B.B.; MORGAN, P.N. An *in vitro* model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*L. reclusa*). **Toxicon** 17: 355-362, 1979.
- FUTRELL, JM. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.** 304:261-267, 1992.
- GANGOITI, P.; GRANADO, M.H.; WANG, S.W.; KONG, J.Y.; STEINBRECHER, U. P.; GÓMEZ-MUÑOZ, A. Ceramide-1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. **Cell Signal.** 20: 726-736, 2008.
- GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*L. reclusa*). **Arch. Biochem. Biophys.** 174:90-99, 1976.
- GERTSCH, W. J., The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History.** 136:117-174, 1967.
- GILBERT, S.F. **Embriology.** Constructing the organism. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.
- GOMEZ H.F.; MILLER, M.J.; WAGGENER, M.W.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S.; Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. **Toxicon.** 39: 6. 817-24, 2001.

GÓMEZ-MUÑOZ, A. Ceramide-1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. **Biochim. Biophys. Acta.** 1758: 2049–2056, 2006.

GOÑI, F.M.; ALONSO, A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. **FEBS Letters.** 531: 38-46, 2002.

GODT, R. E.; LINDLEY, B.D. Influence of Temperature upon Contractile Activation and Isometric Force Production in Mechanically Skinned Muscle Fibers of the Frog. **J. Gen. Physiol.** 80: 279-297, 1982.

HANEL, P.; ANDREANI, P.; GRALER, M. H. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. **FASEB J.** 21:1202–1209, 2007.

HANNUN, Y.A.; LUBERTO, C. Ceramide and the eukaryotic stress response. **Trends Cell Biol.** 10: 2. 73-80, 2000.

HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry.** London: Plenum Press, v. 3: Erythroid Cells. Cap. 7. 1991.

HARRIS, F.; PHOENIX, D.A. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. **Biochimie.** 79: 17. 1-174, 1997.

HASERUCK, N.; ERL, W.; PANDEY, D.; TIGYI, G.; OHLMANN, P.; RAVANAT, C.; GACHET, C.; SIESS, W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. **Blood.** 103: 7. 2585-92, 2004.

HASSOUN, H.; PALEK, J. Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. **Blood Rev.** 10:129-47, 1996.

HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new Directions. **Ann Emerg Med.** 44:608-624, 2004.

HUWILER, A.; KOLTER, T.; PFEILSCHIFTER, J.; SANDHO, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. **Biochim. Biophys. Acta.** 1485: 63-99, 2000.

INGRAHAM, L.M.; BURNS, P.; BOXER, L.A.; BAEHNER, R.L.; HAAK, R.A. Fluidity properties and lipid composition of erythrocyte membranes in chediak-Higashi Syndrome. **J. Cell Biol.** 89: 510-516, 1981.

IVANOV, I.T.; TOLEKOVA, A.; CHAKAAROVA, P. Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance. **J. Biochem. Biophys. Methods.** 70:641–648, 2007.

IVANOV, I.T.; Allometric dependence of the life span of mammal erythrocytes on thermal stability and sphingomyelin content of plasma membranes. **Comp. Biochem. Physiol.** Part A.147:876–884, 2007.

JAIN, S.K. In vivo Externalization of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in the membrane Bilayer and hipercoagulability by the Lipid Peroxidation of Erythrocytes in Rats. **J. Clin. Invest.** 76:281-286, 1985.

KALFA, T.A.; PUSHKARAN, S.; MOHANDAS, N.; HARTWIG, J. H.; FOWLER, V.M.; JOHNSON, J. F.; JOINER, C. H.; WILLIAMS D. A.; ZHENG, Y. Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. **Blood.** 108: 3637-3645, 2006.

KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAÚJO, S. C.; YAZBECKA, G. M.; MANGILI, O. C.; CRUZD, I. OLORTEGUI, C. C.; Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *L. intermedia*. **Toxicon.** 44: 273–280, 2004.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; DORNELAS, H.G.; DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; DE MOURA, J.F.; VEIGA, S.S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**. 2007.

KUCHERENK, Y. V.; BERNHARDT, I. The study of Ca^{2+} influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (peg-1500) and sucrose media. **Укр. біохім. Журн.** 78: 1-6, 2006.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.; SADE, Y.B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**. 1-15, 2008 “in press”.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**. 227: 259. 680-5, 1970.

LAI, E.C. Lipid rafts make for slippery platforms. **J Cell Biol**. 162:365–70, 2003.

LANG, K.S.; MYSSINA, S.; BRAND, V.; SANDU, C.; LANG, P.A.; BERCHTOLD, S.; HUBER, S.M.; LANG, F.; WIEDER, T: Involvement of ceramida in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. **Cell Death Differ**. 11:231-243, 2004.

LANG, P.A.; KEMPE, D.S.; TANNEUR, V.; EISELE, K.; KLARL, B.A.; MYSSINA, S.; JENDROSSEK, V.; ISHII, S.; SHIMIZU, T.; WAIDMANN, M.; HUBER, S.M.; LANG, F.; WIEDER, T. Stimulation of Erythrocyte Ceramide Formation by Platelet Activating Factor. **J Cell Sci**. 118:1233-1243, 2005a.

LANG, K. S.; LANG, P.A.; BAUER, C.; DURANTON, C.; WIEDER, T.; HUBER, S.M.; LANG, F. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. **Cell Physiol Biochem**. 15:195-202, 2005b.

LANG, F.; HUBER, S.M.; SZABO, I.; GULBINS, E. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. **Arch. Biochem. Biophys.** 462:189–194, 2007.

LANGE, Y; SLAYTON J.M.; Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape. **J. Lipid Res.** 23: 8. 1121-1127, 1982.

LARK, M.W.; WALAKOVITS, L.A.; SHAH, T.K.; VANMIDDLESWORTH, J.; CAMERON, P.M.; LIN, T.Y. Production and purification of prostromelysin and procollagenase from IL-1 beta-stimulated human gingival fibroblasts. **Connect Tissue Res.** 25:1. 49-65. 1990.

LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology.** 10th Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. p. 196-217, 1999.

LEE, S.; LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem. J.** 391:317–323, 2005.

LU, J.X. Magnesium chelation inactivates beta-galactosidase in -20 degrees C storage. **Biotechniques.** 12:2. 177-81, 1992.

LUCIANO, M. N.; SILVA, P.H.; CHAIM, O. M.; SANTOS, V.L.O.; 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. **J. Histochem. Cytochem.** 52: 457-467, 2004.

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int. J. Dermatol.** 39: 287-289, 2000.

MACEYKA, M.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate and sphingolipidomics. **Prostag. Other. Lipid. Mediat.** 77:15–22, 2005.

MACHADO, L.F.; LAUGESEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.O.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**. 5: 2167-2176, 2005.

MARCHESINI, N.; HANNUN, Y.A. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. **Biochem. Cell Biol.** 82:27–44, 2004.

MÁLAQUE, 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. **Rev Inst Med Trop S Paulo**. 44, 2002.

MARCHIORO, C.A.; MARTA LUCIANE FISCHER, M.L.; MARQUES DA SILVA, E. Desenvolvimento pós-embriônico de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934, *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. gaucho* Gertsch, 1967 (Araneae; Sicariidae) criadas sob condições de alimentação monoespecífica. **Biotemas**. 18:1 93 - 112, 2005

MARQUES DA SILVA, E.; FISCHER, M.L. Occurrence of species of the genus *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Araneae: Sicariidae) in the Paraná State. **Anais da Reunião Científica Annual do Instituto Butantan**. São Paulo. p.51. Brasil, 2000.

MARQUES DA SILVA, E. **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heineken & Lowe, 1832*, no período de 1993 a 2000**. Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz. São Paulo, 2002.

MELLO-LEITÃO. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles* Lowe. **Ann. Acad. Brás. De Ciencias**. VI. 2, 1934.

MELLO DA SILVA, C. A.; TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. & NICOLELLA, A. D. R. **Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes por *Loxosceles* sp. no sul do Brasil**. Mem Inst Butantan. 52 (supl.): 80, 1990.

MIALE, J.B. **Laboratory medicine hematology**. 6ed. St. Louis. Mosby Company, 1982.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the lesion in loxoscelism. **Toxicon**. 40:409-418, 2002.

MOOLENAAR, W.H. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. **Exp. Cell Res**. 253:230–238, 1999.

MORGAN, B.B.; MORGAN, P.N.; BOWLING, R.E. Lysis of human erythrocytes by venom from the brown recluse spider, *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**. 16:85-88, 1978.

MINETTI, G.; PROHASKA, R.; CIANA, A.; SALZER, U. New and old integral proteins of the human erythrocyte membrane (multiple letters) **Blood**. 101: 3751- 3753, 2003.

MINISTERIO DA SAÚDE – Fundação Nacional da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2a. ed., Brasília, 45-58, 2001.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural Basis for Metal-Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **J Biol Chem**. 280: 13658-13658, 2005.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; ANDRADE,S.A.; GABDOULKHAKOV, A.; BETZEL, C.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Comm**. 342: 323–329, 2006.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier. p171. 1997.

NASLAVSKY N, SHMEEDA H, FRIEDLANDER G, YANAI A, FUTERMAN AH, BARENHOLZ Y, TARABOULOS A. Sphingolipid depletion increases formation of the

scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. **J Biol Chem.** 274: 30. 20763-71, 1999.

OCHI, S.; ODA, M.; NAGAHAMA, M.; SAKURAI, J. *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake. **Biochim. Biophys. Acta.** 1613:79– 86; 2003.

OCHI, S.; ODA, M.; MATSUDA, H.; IKARI, H.; SAKURAI, J. *Clostridium perfringens* α -Toxin Activates the Sphingomyelin Metabolism System in Sheep Erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 279: 13. 12181-12189, 2004.

ODA, M. T.; MATSUNO, R.; SHIIHARA, S.; OCHI, R.; YAMAUCHI, Y.; SAITO, H.; IMAGAWA, M.; NAGAHAMA, M.; NISHIZAWA, M.; J. SAKURAI. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* α -toxin. **J. Lipid Res.** 49: 1039–1047, 2008.

OLIVEIRA K.C., ANDRADE R.M.G., GIUSTI A.L., SILVA W.D., TAMBOURGI D.V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon** 37:217-221, 1999.

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; BUCHI, D.F.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; FRANCO, C.R.C.; The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures, **Toxicon.** 47: 844–853, 2006.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon.** 48:123–137, 2006.

PEDROSA, M. F. F.; AZEVEDO, I. L. M. J., ANDRADE, R. M. G.; BERG, C. W., RAMOS, C. R. R.; HO, P. L.; TAMBOURGUI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem. Bioph. Res. Comm.** 298:638-645, 2002.

- PLATNICK, N.I., 2007. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em 10/10/2007.
- PETERSON, M.E. Brown Spider Envenomation. **Clin Tech Small Anim Pract.** 21:191-193, 2006.
- PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E. H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Pathologica.** 23:33. 1957.
- PUSHKAREVA, M.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y.A.; Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. **Immunol Today.** 16: 6. 294-7, 1995.
- RAINES, M.A.; KOLESNICK, R.N.; GOLDE, D.W. Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid H1-60 cells. **J. Biol. Chem.** 268: 14572-14575, 1993.
- RATTMANN, Y.D.; PEREIRA, C.R.; CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M.C.C.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Vascular permeability and vasodilatation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: Involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon.** 51: 3. 363-372, 2008.
- REES, RS; NANNEY, LB; YATES, RA; KING, LE. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: The inciting mechanism? **J Invest Dermatol.** 83:270-275, 1984.
- RIBEIRO L.A.; Von EICKSTEDT V.R.; RÚBIO G.B.G.; KONOLSAISEN J. F.; HANDAR Z.; ENTRES, M.; CAMPOS V.A.F.P.; JORGE M. T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles*. Heinecken & Lowe no estado do Paraná (Brasil). **Mem Inst Butantan.** 55:19-26, 1993.
- RIBEIRO, R.O.S.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI,

- C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S.S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase-D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon** 50:1162–1174, 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.
- SANT'ANA, C. D.; **Caracterização funcional e estrutural de uma nova serinoprotease do veneno de *Bothrops jararacussu***. Tese (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia. São Paulo, 2005.
- SAKURAI, J.; OCHI, S.; TANAKA, T. Regulation of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin Activated Phospholipase-C in Rabbit Erythrocyte Membranes. **Infect. Immun.** 62: 2. 717 - 721, 1994.
- SALZER, U.; HINTERDORFER, P.; HUNGER, U.; BORKEN, C.; PROHASKA, R. Ca²⁺ dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. **Blood**. 99: 2569-2577, 2002.
- SALZER, U.; MAIRHOFER, M.; PROHASKA, R. Stomatin: A new paradigm of membrane organization emerges. **Dynamic Cell Biology**. 1:1. 20-33, 2007.
- SALZER, U.; HUNGER, U.; PROHASKA, R. Chapter three insights in the organization and dynamics of erythrocyte lipid rafts. **Crit Rev Biomed Eng**. 259. 49-80, 2008.
- SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING, L.E. Necrotic arachdism. **J Am Acad Dermatol** 44: 61-573, 2001.
- SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxocelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. **Rev Inst Med Trop**. 31: 6. 403-15, 1989.

SCHENONE, H. Toxic pictures produces spiders bites in Chile: lactrodectism and loxosceleism. **Rev Med Chil.**131: 4. 437-44, 2003.

SESA - Secretaria Estadual de Saúde Ambiental do Paraná. **Acidentes por animais peçonhentos: Dados do Paraná.** Disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br>> Acesso em 20/09/2007.

SENF-FRIBEIRO A, DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, L.H.; PALUDO, K, S.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins, **Biotechnol Adv.** 26: 3. 210-218, 2008.

SEZERINO, UM; ZANNIN, M; COELHO, LK. A clinical and epidemiological study of L. spider envenoming in Santa Catarina, Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 92:546, 1998.

SHUMILINA, E.; KIEDAISCH, V.; AKKEL, A.; LANG, P. A.; HERMLE, T.; KEMPE, D. S.; HUBER, S. M.; WIEDER, T.; LAUFER, S.; LANG, F. Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Lipooxygenase Inhibitor Bay-Y5884. **Cell Physiol Biochem.** 18:233-242, 2006.

SILVESTRE, F.G.; CASTRO, C.S.; DE MOURA, J.F.; GIUSTA, M.S.; DE MARIA, M.; ÁLVARESC, F.C.F.; LOBATO, E.S.S.; ASSIS, R. A.; GONÇALVES, L.A.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Characterization of the venom from the brazilian brown spider *Loxosceles similes* moenkhaus, 1898 (araneae, sicariidae). **Toxicon.** 46:927–936, 2005.

SIMMONS, A. **Hematology.** Butterworth-Heinemann 2. ed. Oxford, 1997.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature.** 387: 6633. 569-72, 1997.

SMITH, C.W.; MICKS, D.W.; A comparative study of the venom and other components of three species of *Loxosceles*. **Am J Trop Med Hyg** .17:651-6, 1968.

SMS/CE/CVE – SINAM. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico de Curitiba**, 2007.

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**. 51: 151–156, 2008.

SPRAGUE, R.S.; ALAN H. STEPHENSON, A.H.; ELLSWORTH, M.L. Red not dead: signaling in and from Erythrocytes. **Trends Endocrinol Metab**.18: 9. 350-355, 2007.

STELLO, S.L.; LATIMER, K. S.; BAIN, P.J.; KRIMER, P.M. **The Significance of Echinocytosis in Blood Smears**. Department of Pathology. College of Veterinary Medicine - University of Georgia. 2003. Disponível em: <<http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/Stello/index.php>> acesso em: 10/03/2008.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; MCKAY D. B.; BODE. W. The metzincins -Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci**. 4: 823-840, 1995.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**. 24:213–21, 2006.

TANI, M.; ITO, M.; IGARASHI, Y.; Ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. **Cell Signal**. 19: 229–237, 2007.

TAMBOURGI D.V., MAGNOLI F.C., Von EICKSTEDT V.R.D., MORGAN B.P., ALVES E.W., DIAS. DA SILVA W. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent

hemolysis. venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **Biochem Biophys Res Commun.** 251: 366-373, 1998.

TAMBOURGI D.V., MORGAN B.P., 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.** 95: 683-691, 2000.

TAMBOURGI D.V., SILVA M.S., BILLINGTON S.J., ANDRADE R.M.G., MAGNOLI F.G., SONGER J.G. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology.** 107: 93-101, 2002.

TAMBOURGI D.V., FERNANDES-PEDROSA M.F., VAN DEN BERG C.W., GONCALVES DE ANDRADE R.M., FERRACINI M., PAIXAO-CAVALCANTE D., MORGAN B.P., RUSHMERE N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol. Immunol.** 41: 831-840, 2004.

TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES PEDROSA, M.F.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; BILLINGTON, S.J.; GRIFFITHS, M.; VAN DEN BERG, C.W. Sphingomyelinases-D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Mol. Immunol.** 44: 576–582, 2007.

TAVARES, F.L. **Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente pelo veneno loxoscélico em coelhos.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia. São Paulo, 2007.

TAYLOR, E.H.; DENNY, W.F. Hemolysis, renal failure and death, presumed secondary to bite of brown recluse spider. **South Med J.** 59: 1209-1211, 1966.

TORRES, J. B.; CARLOTTO, P. R. Levantamento dos gêneros de ofídios e espécies de aracnídeos causadores de acidentes na casuística do Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul. **Mem Inst Butantan.** 46: 207-218, 1982.

UDDEN, M.M.; Effects of diethylene glycol butyl ether and butoxyethoxyacetic acid on rat and human erythrocytes. **Toxicol Lett.** 156: 95-101, 2005.

VAN MEETEREN, L.A.; FREDERIKS, F.; GIEPMANS, B.N.G.; PEDROSA, M.F.F.; BILLINGTON, S.J.; JOST B.H.; TAMBOURGI D.V.; MOOLENAAR, W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases-D target cellular lysophosphatic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem.** 279: 10833- 10836, 2004.

VEIGA, S.S. Oligosaccharide residues of *L. intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon.** 37: 587-607, 1999.

VEIGA, S.S., FEITOSA, L., SANTOS, V.L.P., DE SOUZA, G.A., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., PORCIONATTO, M. A.; NADER, H.B., DIETRICH, C.P., BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W. Effect of *L. intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures. **Histochem J.** 32: 397- 408, 2000a.

VEIGA, S.S. Identification of high molecular weight serine-proteases in *L. intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon.** 38: 825-839, 2000b

VEIGA SS, ZANETTI VC, FRANCO CRC, TRINDADE ES, PORCIONATTO MA, MANGILI OC, GREMSKI W, DIETRICH CP, NADER HB. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res.**102: 229-237, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34:843-850, 2001b.

VOJTOVÁ, J.; KOFRONOVA, O.; ŠEBŮ, P.; BENADA, O. *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Induces a Cascade of Morphological Changes of Sheep Erythrocytes and Localizes Into Clusters in Erythrocyte Membranes. **Microsc. Res. Tech.** 69:119–129, 2006.

WILLIAMS, S. T.; KHARE, V.K.; JOHNSTON, G.A.; BLACKALL, D.P.; Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. **Am J Clin Pathol.** 104: 463-467, 1995.

XU, Y. H.; LU, Z.Y.; IHLER, G. M. Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. **Biochim Biophys Acta.**1234: 173-183, 1995.

YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *L. rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon.** 39: 391-400, 2001.

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 Coagul Fibrinolysis.**13: 1-14, 2002.

ZHANG, P.; LIU, B.; JENKINS, G.M.; HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. Expression of neutral sphingomyelinase identifies a distinct pool of sphingomyelin involved in apoptosis. **J. Biol. Chem.** 272: 9609-9612, 1997.

ZWAAL, R.F.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E.M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cell. **Cell Mol Life Sci.** 62: 9. 971-88, 1978.

ANEXO

ANEXO 1: Sequência nucleotídica do cDNA clonado da toxina dermonecrótica (LiRecDT1 selvagem) de *Loxosceles intermedia* e a dedução da sequência de aminoácidos (CHAIM *et al.*, 2006). O círculo indica o local de substituição do aminoácido Histidina por Alanina. O que acarreta na redução drástica da atividade esfingomielinásica *in vitro*.

1 TCATGTTGCCGTACATTGTCCTAGTATTGGGGTGTGGAGCGTCTTGTCCCAGGCTGCTCAAACAGATGATGAAGAACGC
 1 M L P Y I V L V L G C W S V L S Q A A Q T D D E E R

30Rec sense
 CTCGAGGCAGGTAATCGTCCGGCCATA

81 GCAGGTAATCGTCCGGCCATATGGATCATGGGGGACATGGTAAATGCCATCGGTCAGATAGACGAGTTCGTGAACCTT
 27 A G N R R P I W I M G H M V N A I G Q I D E F V N L

159 GGAGCAAACCTCCATCGAAACAGACGTGTCTTTCGATGACAAATGCCAATCCTGAGTATACTTATCAGGGCATTCCATGT
 53 G A N S I E T D V S F D D N A N P E Y T Y H G I P C

237 GATTGTGGAAGGAATTGCAAGAAATATGAGAATTTTAAACGATTTTCTGAAAGGTCTCCGAAGCGCCACAACACCTGGT
 79 D C G R N C K K Y E N F N D F L K G L R S A T T P G

315 AATTCAAAGTATCAGGAAAACTGGTCTTAGTCGTGTTTCGACTTAAAGACAGGTAGCCTCTACGATAATCAAGCCAAC
 105 N S K Y Q E K L V L V V F D L K T G S L Y D N Q A N

393 GACGCGGAAAGAAATTGGCGAAGAATCTCTTACAACATTAAGCAATGGAACAATGGCAATAATGGTGGAAAGACATACATA
 131 D A G K K L A K N L L Q H Y W N N G N N G G R A Y I

471 GTGTTATCGATCCCAGACCTTAATCATTATCCACTGATTAAGGATTCAAAGACCAGCTTCAAAGGACGGACACCCA
 157 V L S I P D L N H Y P L I K G F K D Q L T K D G H P

549 GAGTTGATGGACAAAGTTGGACACGACTTCTCCGAAACGACGACATCGGGCGAGTTGGAAAAGCTTACAAGAAAGCA
 183 E L M D K V G H D F S G N D D I G D V G K A Y K K A

627 GGAATAACTGGCCATATTGGCAGAGCGATGGTATCACCAACTGTTTACCACGTGGCCCTTAGTCGTGTGAACGACGCT
 209 G I T G H I W Q S D G I T N C L P R G L S R V N A A

705 GTGGCAAACAGAGATTCCGCAACCGGATTCATTAACAAAGTGTACTACTGGACAGTGGACAAGCGCTCAACGACCAGA
 235 V A N R D S A N G F I N K V Y Y W T V D K R S T T R

783 GATGCACTTGATGCTGGAGTTGACGGCATAATGACCAACTACCCGGATGTTATCACTGATGTTCTCAACGAAGCCGCA
 261 D A L D A G V D G I M T N Y P D V I T D V L N E A A

30Rec antisense
 ACCCACTGTAAGTCTTTATTCCTAGGGC

861 TACAAGAAGAAATCCGAGTTGCCACATACGACGAAAAATCCATGGGTGACATTCAAGAAATAAATCTGCAGGTTGAT
 287 Y K K K F R V A T Y D E N P W V T F K K *

939 TGTGGAAAAACACATGGCAATCTGGATTTCAGATTTTCATTGAACTTTGTTGAAAAACCAATTTGATGCGAAAACT
 1017 AAAAACTATGCACTATGGAAGCTTTGTTCAAAAATATGTTTGTATTATTTGTAACATGTTGAAAAAGTATTTTCA
 1095 GAAATAAATTTTGATCCATGTAAAAA

A

ANEXO 2: Artigo Publicado

ANEXO 3: Artigo Submetido

ANEXO 4: Certificados

ANEXO 5: Termo de Consentimento

ANEXO 6: Histórico

Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom[☆]

Marcia Helena Appel^a, Rafael Bertoni da Silveira^{a,b}, Olga Meiri Chaim^{a,b}, Kátia Sabrina Paludo^a, Dilza Trevisan Silva^a, Daniele M. Chaves^a, Paulo Henrique da Silva^a, Oldemir C. Mangili^c, Andrea Senff-Ribeiro^a, Waldemiro Gremski^{a,d}, Helena B. Nader^b, Silvio Sanches Veiga^{a,*}

^a Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Department of Physiology, Federal University of Paraná, Brazil

^d Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil

Received 26 June 2007; received in revised form 12 November 2007; accepted 15 November 2007

Available online 26 November 2007

Abstract

Brown spider bites are associated with lesions including dermonecrosis, gravitational spreading and a massive inflammatory response, along with systemic problems that may include hematological disturbances and renal failure. The mechanisms by which the venom exerts its noxious effects are currently under investigation. It is known that the venom contains a major toxin (dermonecrotic toxin, biochemically a phospholipase D) that can experimentally induce dermonecrosis, inflammatory response, animal mortality and platelet aggregation. Herein, we describe cloning, heterologous expression, purification and functionality of a novel isoform of the 33 kDa dermonecrotic toxin. Circular dichroism analysis evidenced correct folding for the toxin. The recombinant toxin was recognized by whole venom serum antibodies and by a specific antibody to a previously described dermonecrotic toxin. The identified toxin was found to display phospholipase activity and dermonecrotic properties. Additionally, the toxin caused a massive inflammatory response in rabbit skin dermis, evoked platelet aggregation, increased vascular permeability, caused edema and death in mice. These characteristics in combination with functional studies for other dermonecrotic toxins illustrate that a family of dermonecrotic toxins exists, and includes a novel member with high activity that may be useful for future structural and functional studies.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Dermonecrotic toxin; Phospholipase D; Sphingomyelinase; *Loxosceles*; Venom

1. Introduction

Accidents evoked by the bites of brown spiders (*Loxosceles* genus) named loxoscelism are commonly related to necrotic lesions with gravitational spreading surrounding the bite site and hematological disturbances and renal failure as systemic involvement [1–3].

Loxosceles spider venom is a colorless and crystalline liquid with a mixture of several proteic toxins [4]. Among different toxins found in the venom, the dermonecrotic toxin is the most biologically and biochemically investigated and characterized toxin. This purified molecule alone can, under laboratory conditions, reproduce the major biological effects triggered by whole venom such as dermonecrosis, dysregulated inflammatory response, red blood lysis, platelet aggregation, increased vessel permeability and acute renal failure [1–7]. Previous studies have characterized dermonecrotic toxin as a sphingomyelinase D molecule based on its activity to hydrolyze the phospholipid sphingomyelin into choline and ceramide 1-phosphate [4]. Nevertheless, based on lipid biochemical analysis

[☆] GenBank data deposition information for *L. intermedia* cloned cDNA LiRecDT6 is: EF474482.

* Corresponding author. Fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: veigass@ufpr.br (S.S. Veiga).

the term sphingomyelinase D has been replaced by phospholipase D to represent a more accurate and broader denomination since the toxin hydrolyzes not only sphingophospholipids but also lysoglycerophospholipids to generate ceramide 1-phosphate (C1P) or lysophosphatidic acid (LPA) [8]. It is postulated that by hydrolyzing phospholipids that generate ceramide 1-phosphate or lysophosphatidic acid, the dermonecrotic toxin activates signaling pathways in different cells causing pathophysiological changes such as inflammatory response, platelet aggregation, and increased blood vessel permeability [8–10].

From literature data it is believed that the dermonecrotic toxin is a representative of a large family of related toxins with biological, amino acid and immunological homologies found in the venom of different *Loxosceles* species [1,3,6,7]. Today, through biochemical and molecular biology approaches, this definition has been complemented by the idea of an intraspecies family of homologous toxin isoforms of phospholipase D molecules. From the study of *L. reclusa* venom, the existence of four biochemically related isoforms for a native purified dermonecrotic toxin was reported [4]. Working with *L. gaucho* venom, Cunha et al. [11] reported similar data, characterizing two isoforms of the enzyme. Additionally, by using proteomics methodologies such as bidimensional electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing and mass spectrometry, eleven isoforms for phospholipase D toxin in *L. gaucho* venom were reported [12]. Similarly, by N-terminal sequence data from *L. boneti* venom, the existence of at least three different isoforms of dermonecrotic toxin was reported [13]. Finally, the idea of an intraspecies family of homologous toxins was strengthened by the use of molecular biology and recombinant toxin technologies. Binford et al. [14] analyzed *L. arizonica* and reported the existence of three cDNA sequences for venom phospholipase D. Through the isolation of cDNA libraries from venom glands, the cloning, heterologous expression and functionality of several different isoforms of dermonecrotic toxins in *L. intermedia* were reported [5–7,15]. This data taken together corroborates the existence of an intraspecies family of dermonecrotic toxins (phospholipase D) and suggests a synergism among different isoforms in the crude venom.

We report herein the cloning, heterologous expression, purification and functional analysis of a novel dermonecrotic toxin isoform from a cDNA library of *L. intermedia* venom glands. The purified recombinant toxin displayed phospholipase activity besides causing necrotic lesions in rabbit skin. The toxin also caused a massive inflammatory response in the dermis, increased vessel permeability, edema, evoked mouse lethality and induced platelet aggregation, all activities triggered by native venom related dermonecrotic toxins.

2. Methods

2.1. Reagents

Polyclonal antibodies to *L. intermedia* venom toxins and dermonecrotic toxin (*LiRecDTI*) were produced in rabbits as described by [5]. IgGs were purified from serum using a mixture of Protein-A and Protein-G Sepharose beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) as recommended by the manufacturer. Whole venom from *L. intermedia* was extracted from spiders captured in the wild

following Feitosa et al. [16]. Evans Blue dye was purchased from Vetec (São Paulo, Brazil). Formamide was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. cDNA Cloning

The partial cDNA sequence for the dermonecrotic toxin isoform 6 described herein was isolated from a venom gland cDNA library previously built as described by [5]. Randomly chosen colonies were transferred to 1.5 ml microtubes containing 20 μ l water and the suspensions were incubated in a boiling water bath for 10 minutes. The tubes were centrifuged for 30 minutes at 20,000 \times g (4 $^{\circ}$ C) and the supernatants were applied to sequencing reactions on both strands using a DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) on an ABI 377 automatic sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK). The putative protein product from the sequenced cDNA was used to search the GenBank protein databases at NCBI [17].

2.3. Amplification of the 5' end of the cDNA

To obtain the complete 5' end of dermonecrotic toxin cDNA, a 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) protocol was performed following Sambrook and Russel [18] with some modifications. Starting with 1 μ g total RNA from *L. intermedia* venom glands, the first-strand cDNA was synthesized by using the gene-specific reverse primer R1 (5'-GCCAGATGTTCTT-TATCTTGC-3') and the Improm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was recovered by ethanol precipitation in the presence of ammonium acetate and was subsequently poly(A)-tailed with terminal deoxynucleotidyl transferase (Fermentas, Hanover, MD, USA) as recommended by the supplier. The modified cDNA was amplified by PCR with the (dT)₁₇ adaptor primer (5'-CGGTAC-CATGGATCCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') and the nested gene-specific reverse primer R2 (5'-CATCATAAGCAGTAGAAGCGGTC-3') by the use of *Pfu* DNA polymerase (Fermentas). The PCR product was gel-purified using the PerfectPrep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) following the manufacturer's instructions and was sequenced on both strands.

2.4. Recombinant protein expression

Starting with 1 μ g total RNA from *L. intermedia* venom glands, the complete cDNA for the toxin was amplified by RT-PCR using the gene-specific primers P6 Forward (5'-ATCACTTATATTTGATCAGAAGGAAAATC-3') and P6 Reverse (5'-AGAAACACATTTTAATTCGGTAATTAGG-3'), employing Improm-II Reverse Transcriptase, *Pfu* DNA Polymerase and *Taq* DNA Polymerase. The product was gel-purified and ligated into the pGEM-T Vector (Promega). The fragment of the cDNA encoding for the putative mature dermonecrotic protein was amplified by high fidelity PCR using the previous construct as a template and primers designed to contain an *Xho* I restriction site (forward primer) and a *Bam*H I site (reverse primer) at the 5' ends. The PCR product was digested with *Xho* I and *Bam*H I restriction enzymes and subcloned to pET-14b (Novagen, Madison, USA) digested with the same enzymes. The recombinant construct was expressed as a fusion protein, with a 6x His-Tag at the N-terminus and a 13 amino acid linker including a thrombin site between the 6x His-Tag and the mature protein. The expression construct was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells and plated on LB plates containing 100 μ g/ml ampicillin and 34 μ g/ml chloramphenicol. Single colonies of toxin/pET-14b constructs were inoculated into LB broth (100 μ g/ml ampicillin and 34 μ g/ml chloramphenicol) and grown overnight at 37 $^{\circ}$ C. This culture was diluted 1:100 into 1 L fresh LB broth/ampicillin/chloramphenicol and incubated at 37 $^{\circ}$ C until the OD_{550 nm}=0.5. Recombinant expression was induced by the addition of IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) to 0.025 mM and incubated for 3.5 h at 30 $^{\circ}$ C. Cells were harvested by centrifugation (4,000 \times g, 7 min, 4 $^{\circ}$ C), resuspended in 40 ml of extraction buffer (50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mg/ml lysozyme) and frozen at -20 $^{\circ}$ C overnight.

2.5. Protein purification

Cells were thawed and disrupted by 6 cycles of sonication for 10 seconds each at low intensity. The lysed materials were centrifuged

(20,000 ×g, 20 min, 4 °C) and the supernatants were incubated with 1 ml Ni²⁺-NTA agarose beads for 1 h at 4 °C. The suspensions were loaded onto a column and the packed gel was washed with the buffer consisting of 50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, and 20 mM imidazole. The recombinant protein was eluted with 10 ml of elution buffer (50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole) and 1 ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions. Fractions were pooled and dialyzed against phosphate buffered saline (PBS).

2.6. Phospholipase activity assay

Sphingomyelinase activity was measured using the Amplex Red Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, USA). In this assay, sphingomyelinase-D activity is monitored using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent), a sensitive fluorogenic probe for H₂O₂ [7]. First, sphingomyelinase hydrolyzes sphingomyelin to yield ceramide-phosphate and choline. Choline is oxidized by choline oxidase to betaine and H₂O₂. Finally, H₂O₂, in the presence of horseradish peroxidase, reacts with Amplex reagent in a 1:1 stoichiometry to generate the highly fluorescence product, resorufin. Whole venom or recombinant toxin (5 and 10 µg each, in three trials) were added to the Amplex Red reagent mixture. The reaction tubes were incubated at 37 °C for 30 minutes and fluorescence was measured in a spectrofluorometer (Shimadzu Model RF-

5301 PC Fluorescence Spectrophotometer) using excitation at 540 nm with emission detection at 590 nm.

2.7. Animals

Adult Swiss mice (25–30 g) and adult rabbits weighing approximately 3 kg from the Central Animal House of the Federal University of Parana were used for *in vivo* experiments with whole venom and recombinant toxin. All procedures involving animals were carried out in accordance with “Brazilian Federal Laws”, following the Ethical subcommittee on research animal care agreement number 126 of the Federal University of Parana.

2.8. *In vivo* studies on rabbits

For the evaluation of the dermonecrotic effect, 10 µg of purified toxin diluted in PBS was injected intradermally into a shaved area of rabbit skin. Dermonecrosis was checked 6 h and 24 h after injection. For a negative control to assure that bacterium constituent contamination during purification did not influence results, was used a recombinant toxin with similar molecular mass and obtained from the same cDNA library. This toxin was characterized as an “Astacin-like metalloprotease” [38] and it causes no dermonecrosis evidenced by dermonecrotic assay, followed rabbit injection into the skin (data not shown). Rabbits were used in experiments for dermonecrosis because this animal model

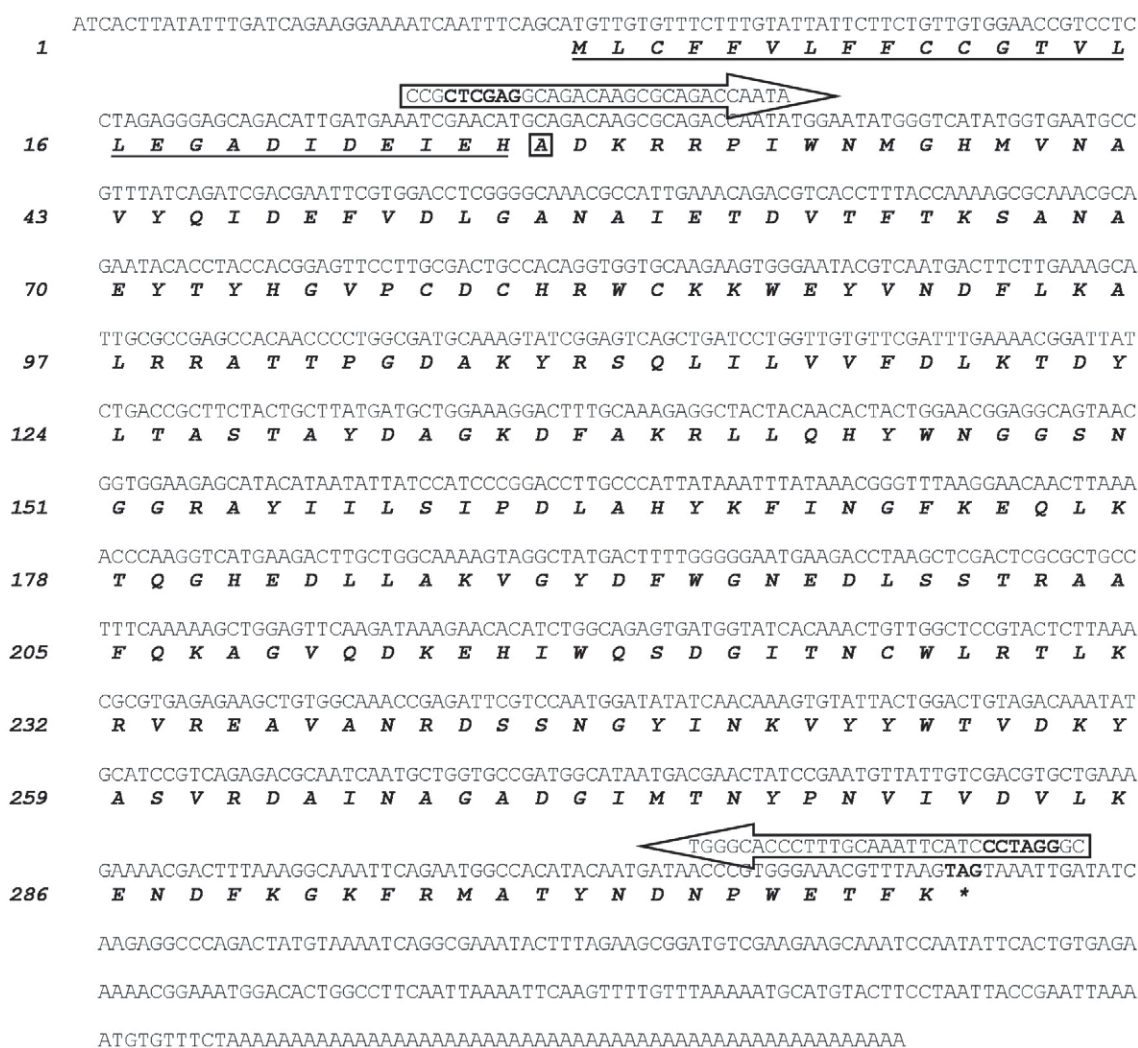


Fig. 1. Molecular cloning of dermonecrotic toxin 6 from *L. intermedia* venom gland cDNA library. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cloned cDNA for toxin 6. In the protein sequence, the predicted signal peptide is underlined. Arrows show the annealing positions for primers used for subcloning into the expression vector. Alanine in the box indicates the first amino acid of the mature protein with 281 amino acids. The asterisks correspond to the stop codons TAG.

reproduces skin lesions very close to those seen in accidents with humans [1,4]. Experiments were repeated three times.

2.9. Mouse intraperitoneal injections

Mouse mortality studies were conducted with adult Swiss (25–30 g) animals. Whole venom or purified recombinant toxin (50 and 100 µg/Kg of mice) were each injected intraperitoneally into five mice. A recombinant toxin

without dermonecrotic activity was used as negative control. The mice were observed for 8, 16 and 24 h after injection and survival was assessed at one-hour intervals.

2.10. Gel electrophoresis and immunoblotting

Protein content was determined by the Coomassie Blue method (BioRad, Hercules, USA) and was also done using guanidine-denatured protein method

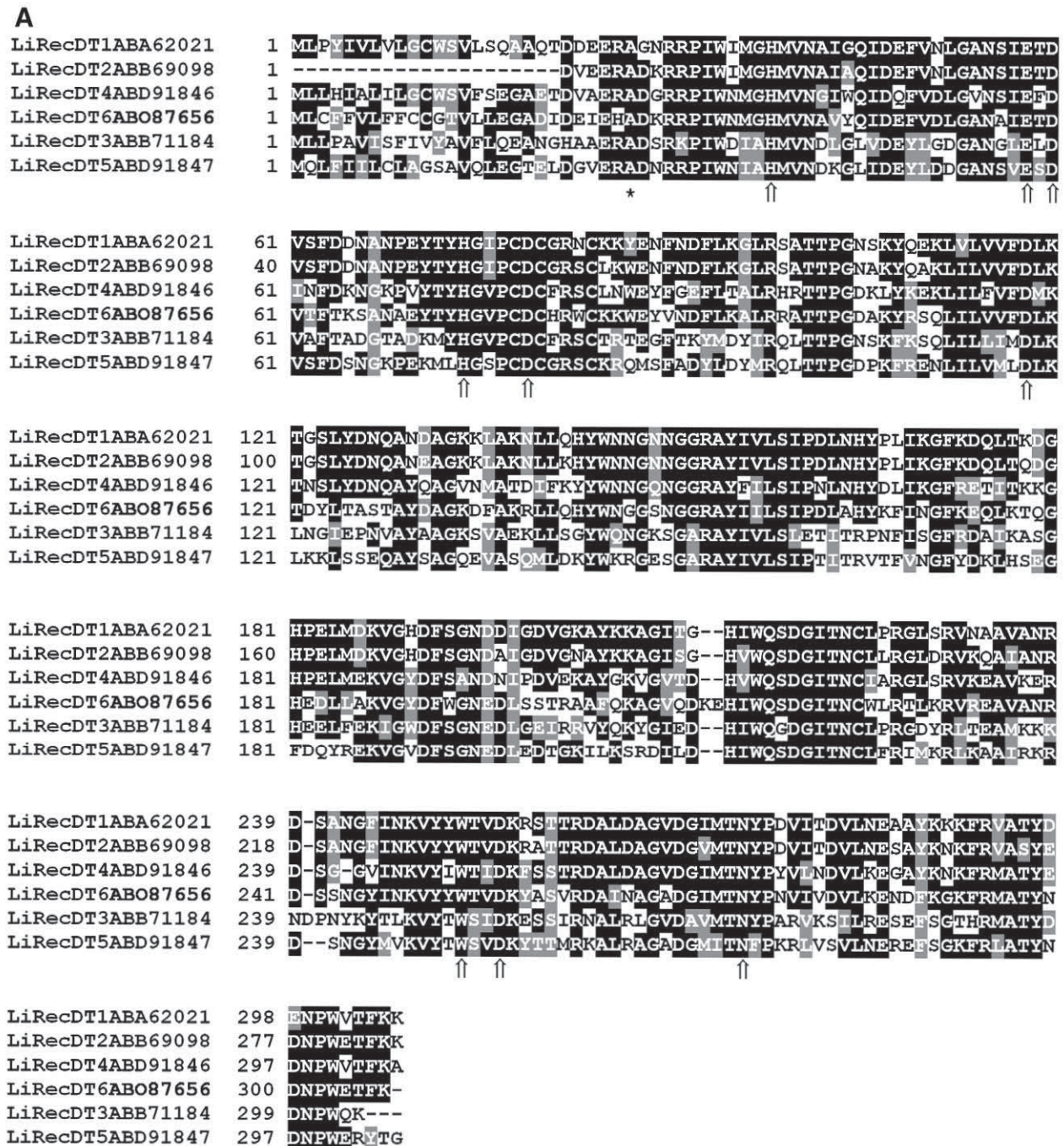


Fig. 2. Amino acid alignment and phylogenetic relationship of dermonecrotic toxin members. (A) Multiple alignment analysis of the cDNA-derived amino acid sequences for LiRecDT1 (ABA62021), LiRecDT2 (ABB69098), LiRecDT3 (ABB71184), LiRecDT4 (ABD91846), LiRecDT5 (ABD91847) and LiRecDT6 (ABO87656) from *L. intermedia* venom gland. Black shaded regions show amino acid identity, grey shaded regions show conservative substitutions, and arrows point to amino acid residues of the phospholipase catalytic site of the toxins. (B) Phylogenetic relationship of LiRecDT6 to other cloned dermonecrotic toxin family members. Sequences were aligned using the CLUSTAL W program (www.ebi.ac.uk/CLUSTAL). Phylogeny of the cloned dermonecrotic toxin members are based on sequence alignment from GenBank data. The tree was constructed with the program CLUSTAL as described above.

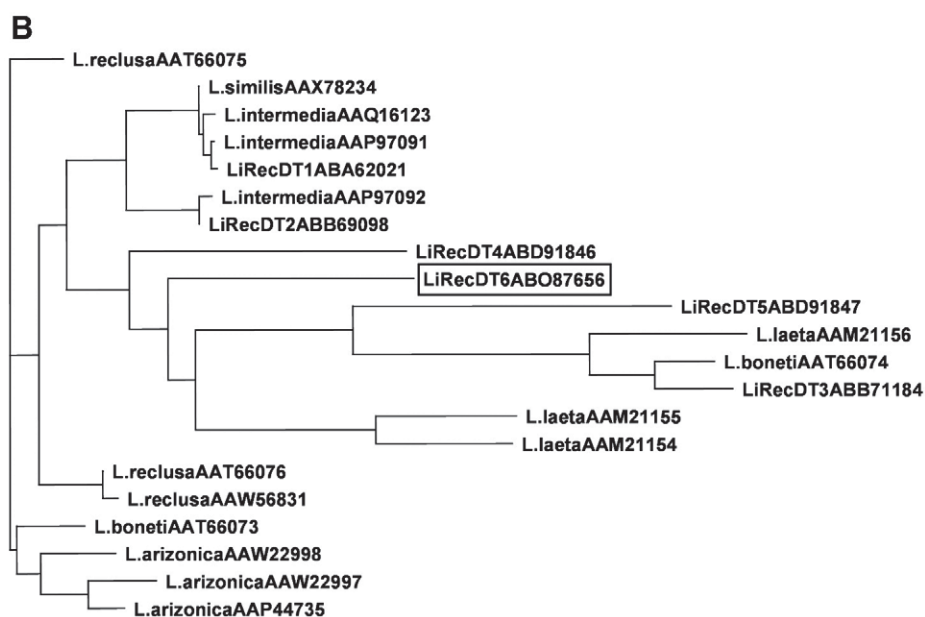


Fig. 2 (continued).

(6 M Gn-HCl, 20 mM phosphate buffer pH 6.5) and A280 nm. There was reproducibility for both methods. For protein analysis, 12.5% SDS-PAGE under reduced conditions was performed and for immunoblotting, proteins were transferred to nitrocellulose filters and immunostained by using purified IgGs which reacts with dermonecrotic toxin LiRecDT1 or against whole venom toxins. The molecular mass markers were acquired from Sigma.

2.11. Circular dichroism spectra measurements

For circular dichroism spectra measurements, recombinant toxin was dialyzed at 4 °C against 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 and spectra were recorded in a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) using a 1 mm gap cuvette. Each spectrum (0.5 nm interval) was the average of 8 measurements, performed at a rate of 50 nm min⁻¹ using a response time of 8 s and a bandwidth of 1 nm. The temperature was kept constant at 25 °C. The secondary structure of the toxin was estimated from the spectra using the Self Selcon3 method in the Dicroprot 2000 1.0.4 software [19].

2.12. Histological methods for light microscopy

Rabbit skin was collected from animals anesthetized with ketamine (Agribands, Campinas, Brazil) and acepromazine (Univet, São Paulo, Brazil) and then fixed in “ALFAC” (absolute ethanol 85%, formaldehyde 10% and glacial acetic acid 5%) for 16 h at room temperature. After fixation, samples were dehydrated in a graded series of ethanol before paraffin embedding (for 2 h at 58 °C). Then, thin sections (4 μm) were processed for histology. Tissue sections were stained by hematoxylin and eosin (HE) [20].

2.13. Platelet aggregation assay

Human platelet-rich plasma was obtained by differential centrifugation from fresh human blood drawn into acid-citrate-dextrose. Platelet aggregation due to whole venom or recombinant toxin (10 μg/ml) was recorded at 37 °C at a stirring rate of 1000 rpm using a Chrono-Log Whole Blood Aggregometer [6,7].

2.14. Measurement of vascular permeability

Evans Blue dye diluted in saline was administered intravenously (30 mg/kg of mice) 5 min prior to sample injections. Whole venom and

recombinant toxin (10 μg) were injected intradermally into the dorsal skin of mice (n=5 per treatment). After 30 minutes, animals were anesthetized as previously described, sacrificed, and the dorsal skin was removed for visualization of dye extravasation. The patches of skin were excised and incubated in 2 ml of formamide at room temperature for 5 days after which the absorbency of the resulting supernatant was measured at 595 nm. For a negative control, animals received a saline injection without venom toxins [21]. Mice were used because this animal model does not develop dermonecrosis and local hemorrhage following brown spider venom exposure, an event that could mask vascular permeability interpretation [1,4].

2.15. Paw edema forming activity

Paw edema development was measured at different time intervals using the method described by Sharma et al. [22]. Groups of five mice were injected subcutaneously (s.c.) into the right hind paw with whole venom, or recombinant toxin (10 μg dissolved in 20 μl sterile PBS). Control mice were injected with 20 μl sterile PBS. Edema was estimated by the change of paw thickness using a digital micrometer (Great, MT-045B). To minimize variation due to technique, a single investigator performed the measurements throughout any one experiment.

2.16. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) with the post-hoc Tukey test in the GraphPad InStat program version 3.00 for Windows 2000. Significance was considered when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Cloning of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from *L. intermedia* venom gland

By screening clones of a cDNA library of *L. intermedia* venom gland, a partial cDNA encoding for a new dermonecrotic toxin was obtained. The complete cDNA sequence was amplified by RT-PCR in a 5'RACE protocol. The putative

protein product from this cDNA was designated LiRecDT6 (from *Loxosceles intermedia* recombinant dermonecrotic toxin). LiRecDT1 [5], LiRecDT2 and LiRecDT3 [6] and LiRecDT4 and LiRecDT5 [7], have been previously reported. The complete cDNA sequence of the toxin comprises 1,199 bp with a single ORF coding for 307 amino acids and a very hydrophobic and putative signal peptide with 26 amino acids (Fig. 1). The calculated molecular mass of the predicted mature protein was 32.3 kDa and pI 8.23.

3.2. Multiple alignment analysis of the cDNA-deduced amino acid sequences and the phylogenetic relationship of LiRecDT6 to other dermonecrotic toxin family members

A Blast Genbank database search revealed that LiRecDT6 is homologous to other LiRecDT family members. The overall identity of LiRecDT6 is about 64% as compared with LiRecDT1, the first and very active toxin described [5,6]. LiRecDT6 is most homologous to LiRecDT2, sharing 67% sequence identity and 59% to LiRecDT4. Amino acid residues of the catalytic site for phospholipase activity [23] share 100% similarity among the toxins (Fig. 2A). A phylogenetic analysis (Fig. 2B) established among dermonecrotic toxin isoform 6 and other brown spider dermonecrotic toxins cloned from cDNAs supports a great similarity of LiRecDT6 to dermonecrotic toxins from *L. intermedia* venom and toxins from *L. similis* (AAX78234).

3.3. Expression and purification of LiRecDT6

LiRecDT6 was expressed using a six histidine tag for the N-terminal residues. Expression was performed in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS cells. The expression of recombinant protein was optimal when induced for 3.5 h with 0.025 mM IPTG. Purification of recombinant toxin using the soluble fraction of cell lysates under native conditions was performed with Ni²⁺-chelating chromatography and resulted in 2.9 mg/L. The SDS-PAGE mobility of recombinant protein reduced by β -mercaptoethanol treatment was 33KDa (Fig. 3A). Differences between the deduced molecular mass and SDS-electrophoretic mobility were consequences of the 6X His tag fusion peptide. Immunoblot analysis with a dermonecrotic toxin specific antibody (to LiRecDT1) and antibodies for whole venom toxins (that are efficient in inhibition of dermonecrosis) established an immunological relationship of purified recombinant toxin LiRecDT6 with LiRecDT1 and native venom toxin(s) (Fig. 3B). Both antibodies cross-reacted with purified LiRecDT6, demonstrating that whole venom contains similar native protein(s) to this recombinant toxin and LiRecDT6 shows sequence/epitope identity and antigenic cross-reactivity with the dermonecrotic toxin LiRecDT1, the prototype of family. Folding for reported LiRecDT6 was deduced from the circular dichroism spectrum of toxin, a technique that provides information about the secondary and tertiary structures of proteins. As depicted in Fig. 3C, the spectrum corresponds to a secondary structure content of approximately 40% α -helix, 14% β -sheet, 11% turns and 34% others.

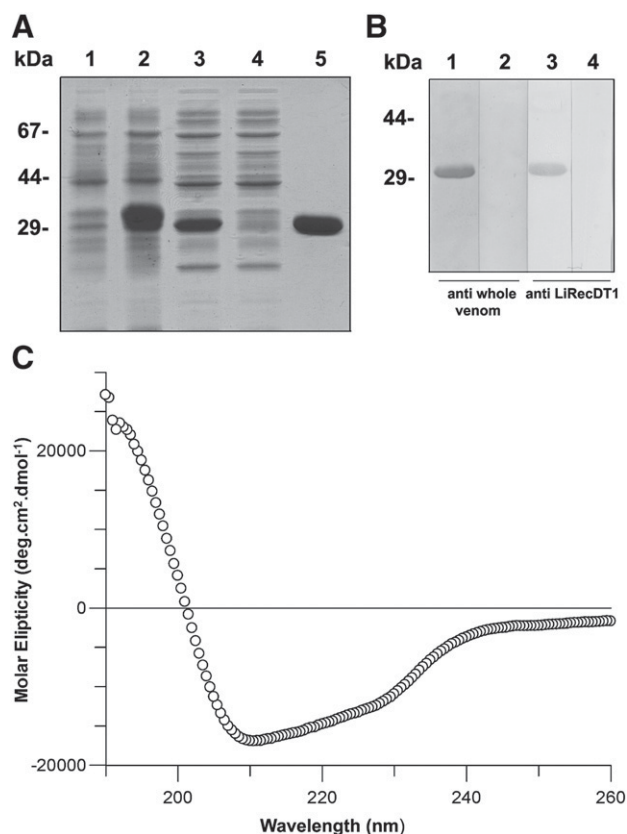


Fig. 3. Expression, purification and circular dichroism analysis of recombinant dermonecrotic toxin (LiRecDT6). (A) The expression and purification of the recombinant toxin was analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions and Coomassie blue dye staining. Lanes 1 and 2 depict *E. coli* BL21(DE3)pLysS before and after 3.5 h induction, respectively, with 0.025 mM IPTG. Lanes 3 and 4 show the supernatant of cell lysates induced with 0.025 mM IPTG by freeze thawing and sonication in the extraction buffer before and after affinity chromatography, respectively, using an Ni²⁺-NTA agarose column. Lane 5 shows the purified recombinant protein. Molecular protein mass standards are shown on the left. (B) Purified recombinant toxin LiRecDT6 at a concentration of 2.5 μ g was separated by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions, transferred onto nitrocellulose membranes that were exposed to purified antibodies against whole venom toxins (lane 1) or antibodies to LiRecDT1 (lane 3). Lanes 2 and 4 indicate reactions in the presence of pre-immune sera (control for antibody specificity). Molecular mass markers are shown on the left. (C) Circular dichroism spectrum for purified recombinant toxin LiRecDT6. The spectrum was obtained using toxin in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, at 25 °C. Secondary structures were estimated using the Dichroprot 2000 1.0.4 software.

3.4. Phospholipase activity for LiRecDT6

Additionally, to further test recombinant toxin functionality, LiRecDT6 was assayed for its activity as a phospholipase, since the native brown spider dermonecrotic toxin has phospholipase D activity. Sphingomyelinase activity was measured using an Amplex-R-Red Sphingomyelinase Assay Kit (as described in the Methods section). Whole venom was used as a positive control and a purified recombinant *L. intermedia* venom toxin devoid of dermonecrotic effect but obtained and purified under the same conditions as described for LiRecDT6 was used as a negative control. Samples of 5 and 10 μ g were tested in three subjects each. As shown in Fig. 4, LiRecDT6 had concentration

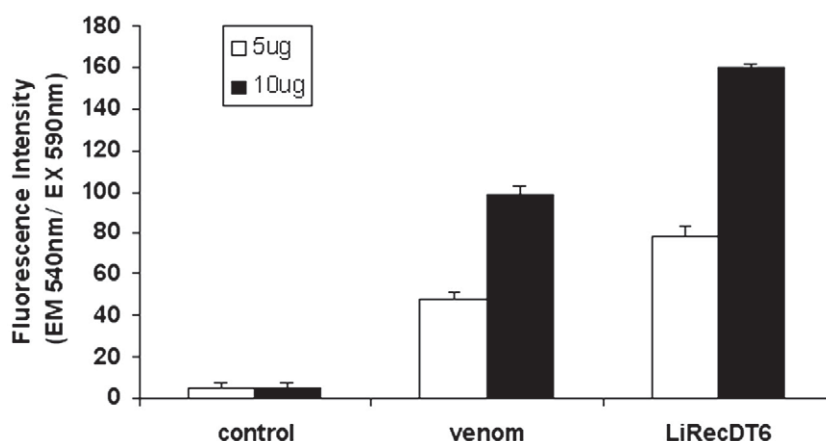


Fig. 4. Sphingomyelinase activity of recombinant toxin. Sphingomyelinase activities of whole venom or recombinant dermonecrotic toxin LiRecDT6 were evaluated with the Amplex Red Assay Kit at 37 °C for 2 h; the product of the reaction was determined at 540 nm (absorption) with emission detection at 590 nm. A purified recombinant toxin without dermonecrotic and inflammatory activities was used as negative control. Reactions used 5 and 10 µg of venom or recombinant toxins ($n=5$). Values given are the average \pm SEM.

dependent sphingomyelinase activity and this activity was higher than the whole venom (positive control) when samples were normalized for protein contents. The negative control had no sphingomyelinase activity.

3.5. Necrotic skin lesion and inflammatory response evoked by recombinant toxin LiRecDT6

To evaluate the functionality of recombinant toxin, a sample of LiRecDT6 (10 µg) was injected intradermally into shaved rabbit skin. As a negative control we used a venom recombinant toxin without dermonecrotic activity but expressed and purified under the same conditions for LiRecDT6 (see Material and Methods) and whole venom was used as a positive control. The macroscopic lesions were checked at 6 h and 24 h (Fig. 5A). Tissue samples were collected and histologically analyzed by light microscope 24 h after toxins exposure (Fig. 5B). Animals that received recombinant toxin responded in a time dependent manner similar to whole venom. Following exposure to LiRecDT6, lesions had a deep erythema, a diffuse edema surrounding the lesion, and a halo of ischemic tissue at the injection site. The histopathological findings of skin biopsies after whole venom and recombinant toxin exposure showed similar responses, but emphasizing a massive inflammatory response with neutrophil leukocytes spread diffusely within the dermis. The negative control showed no inflammatory response. The recombinant toxin LiRecDT6 therefore possesses functionality as a dermonecrotic and inflammatory member and concurs with the family of dermonecrotic toxins.

3.6. Recombinant toxin LiRecDT6 activity upon *in vitro* platelet aggregation

To support the functionality of toxin isoform 6 (10 µg), an *in vitro* platelet aggregation study was carried out since brown spider venom and native dermonecrotic toxin are remarkable for inducing platelet aggregation and thrombocytopenia [1,3,4]. Using human platelet-rich plasma, an *in vitro* aggregation assay

was performed in a platelet aggregometer. Whole venom was used as a positive control and saline was used as a negative control. The maximal platelet aggregation induced was determined after 10 minutes. Platelet aggregation occurred in following both whole venom and LiRecDT6 whereas saline only displayed residual platelet aggregation activity (Fig. 6).

3.7. Mouse mortality induced by recombinant toxin LiRecDT6

It is known that mouse mortality due to *Loxosceles* spider venom is attributed to the dermonecrotic fraction of the venom [1,4,24]. Therefore, to demonstrate the recombinant toxin LiRecDT6 functionality, Swiss mice received 50 and 100 µg/Kg of whole venom and purified LiRecDT6. A recombinant toxin devoid of dermonecrotic and inflammatory activities was used as a negative control ($n=5$ per treatment). The death: survival ratio was determined after 8, 16 and 24 h. Whole venom and LiRecDT6 induced mice mortality even at the lower dose assayed after 24 h, while the negative control showed no effect (Table 1). Results strengthened the functionality for LiRecDT6.

3.8. Recombinant LiRecDT6 toxin induced vascular permeability and edema

To test whether LiRecDT6 could change vessel integrity and permeability *in vivo*, recombinant toxin (10 µg) was injected into the skin of mice that had been previously Evans blue dye-perfused (Miles assay), along with the appropriate negative control (saline) and a positive control (whole venom). Dermonecrotic toxin LiRecDT6 resulted in Evans blue extravasation compared to the negative control (Fig. 7A and B). Edema in mice due to LiRecDT6 was also compared by measuring the paw thickness after inoculation with recombinant toxin (10 µg). LiRecDT6 induced edema in the mouse paw. Paw thickness increased rapidly (10 minutes) after injection of toxin, and was sustained for at least 6 h. There was no macroscopic evidence of hemorrhage under conditions used (Fig. 7C). These

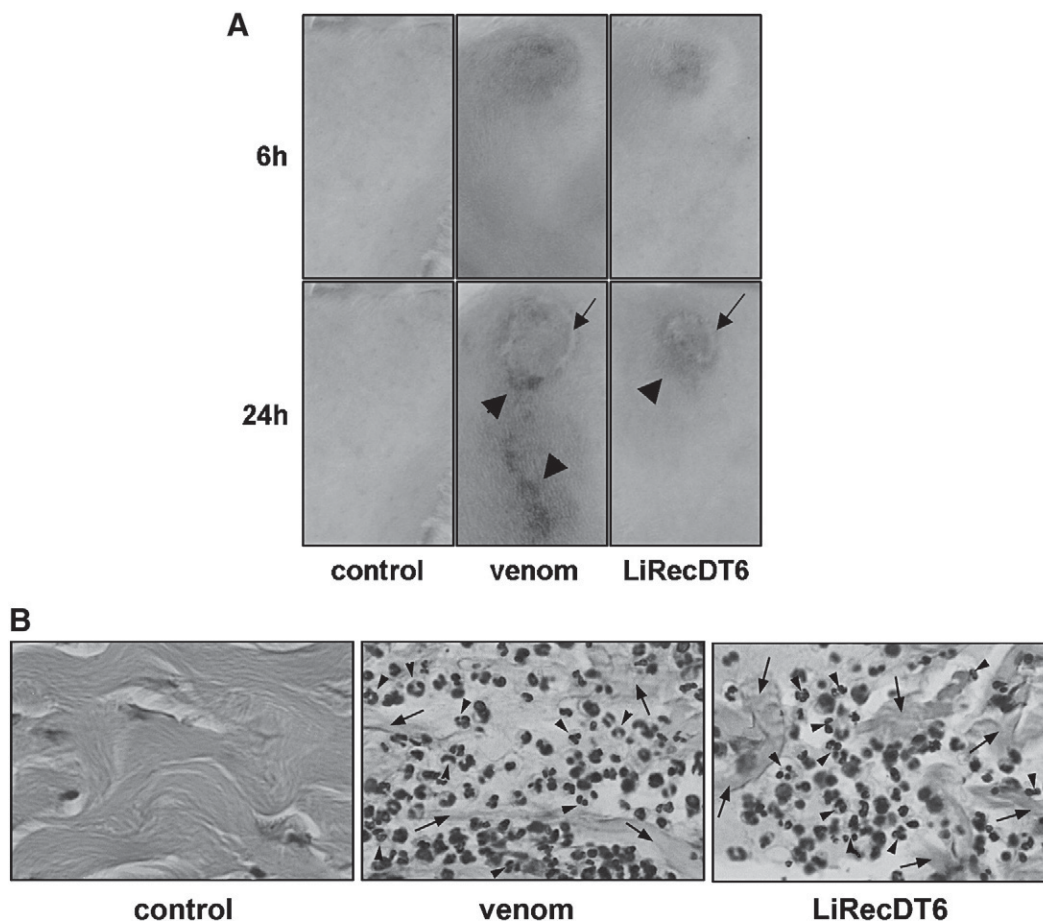


Fig. 5. Macroscopic and histological responses of rabbit skin exposed to recombinant toxin. (A) Macroscopic visualization of dermonecrosis of rabbits intradermally injected with 10 μ g of whole venom or LiRecDT6. As a negative control, a recombinant toxin without inflammatory activity but obtained under identical conditions was used. Lesions were observed 6 h, 24 h following venom and toxin injections. Arrows indicate the ischemic halo surrounding the injection site and arrowheads indicate gravitational spreading of lesions. (B) Histopathological features of the skin of rabbits 24 h after whole venom and purified recombinant toxins exposure. Light microscopic analysis of sections of dermonecrotic lesions stained with HE. Histopathological results after exposure to whole venom and recombinant dermonecrotic toxin 6 were quite similar. At this stage there was a massive inflammatory response with the presence of neutrophils in the dermis (arrowheads), disorganization of collagen fibers, and edema of the dermis (arrows), compared to negative control (magnification of 630X).

results suggest edematogenic activity of LiRecDT6 that follows the observed increase in vascular permeability.

4. Discussion

The dermonecrotic family members found in the venom of the *Loxosceles* spider genus are related to several biological properties ascribed by crude venom including dermonecrosis, inflammatory response, platelet aggregation, increase in the blood vessel wall permeability, red blood cell lysis, renal failure and animal lethality [1–4,25]. The mechanism by which *Loxosceles* venom dermonecrotic toxins act is under investigation, but for necrotic skin lesions literature data have been demonstrated the involvement of an up regulated inflammatory response playing an essential role in this pathophysiological event [1,4]. Dermonecrotic toxin induces an indirect and dysregulated neutrophil activation caused by blood vessel endothelia [26], which initiates a coagulative aseptic necrosis [27,28].

Biochemically, dermonecrotic toxins are classified as phospholipase D by the fact that they hydrolyze lysoglycer-

ophospholipids and sphingophospholipids to generate lysophosphatidic acid and ceramide 1-phosphate [8]. Lysophosphatidic acid and ceramide 1-phosphate are important lipid mediators involved in several physiological and pathophysiological functions resembling those of dermonecrotic toxins such as inflammatory response, platelet aggregation and vessel hyperpermeability [9,29,30].

Here, we described the cloning, heterologous expression, affinity purification and functionality of a novel dermonecrotic toxin family member, corroborating previous proteomic and immunological data [12,24]. The recombinant toxin identified herein is designated LiRecDT6 (GenBank Accession numbers LiRecDT1 DQ218155 [5], LiRecDT2 DQ266399 and LiRecDT3 DQ267927 [6], LiRecDT4 DQ431848 and LiRecDT5 DQ431849 [7] and increased the family with one additional member.

Our cloning strategy for dermonecrotic toxin 6 cDNA was based on random sequence analysis from a cDNA library constructed from the *L. intermedia* venom glands, a Blast search at NCBI for similarities with previous cloned dermonecrotic

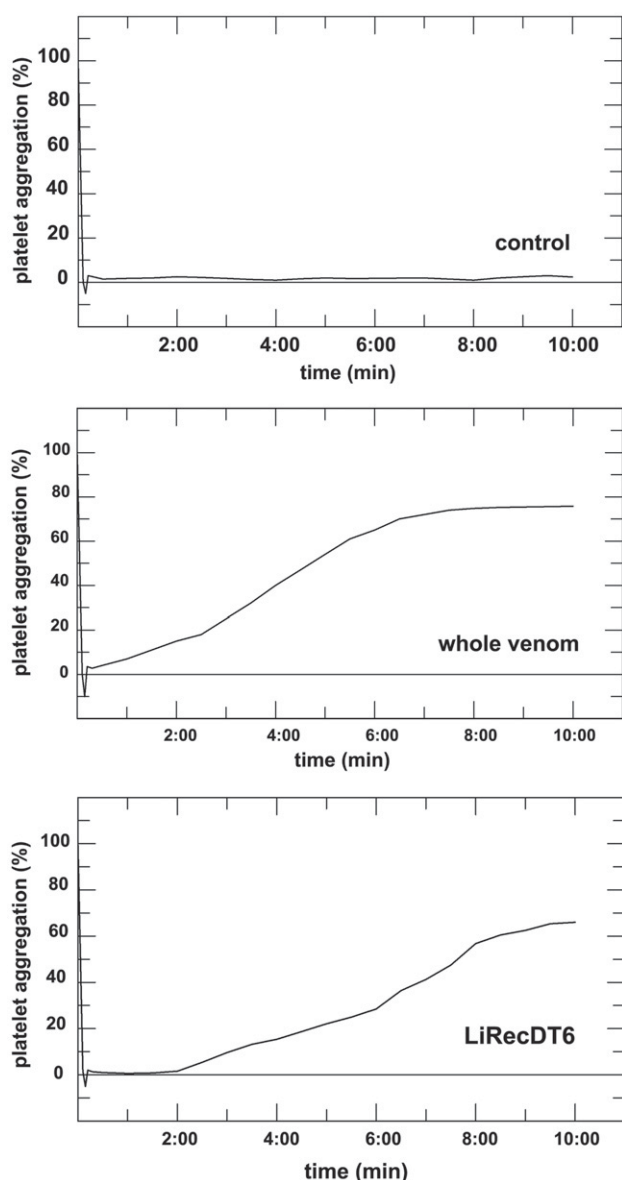


Fig. 6. Effect of recombinant toxin on platelet aggregation. Platelet-rich plasma was incubated with whole venom, LiRecDT6 (10 μ g) or PBS that was used as negative control. Aggregation was monitored by measuring the light transmittance for 10 minutes by an aggregometer. The abscissa is the time in minutes and the ordinate is percent platelet aggregation.

toxins and 5'RACE amplification reaction. The toxin isoform 6 sequence includes a signal peptide and a mature protein with high identity to other brown spider dermonecrotic toxin molecules [5–7,14,31]. The deduced LiRecDT6 protein displayed an amino acid sequence identity of 64% compared with LiRecDT1 DQ218155 the first member described of the series. The highest sequence similarity to LiRecDT6 was found for dermonecrotic toxin LiRecDT2 of *L. intermedia* DQ266399 (67% amino acid identity). Finally, LiRecDT6 possess the amino acid residues involved in catalysis or metal ion coordination important for phospholipase D activity [23].

Additional evidences support the hypothesis that LiRecDT6 belongs to the dermonecrotic toxin family. First, by using immunological studies, LiRecDT6 cross-reacted with antio-

dies raised against whole venom toxins and antibodies against LiRecDT1, the prototype of the family of toxins [5,6], supporting the homology of venom toxins and this recombinant toxin. Additionally, the molecular mass and the isoelectric point calculated from the deduced amino acid sequence of the mature protein are very close to those described for other dermonecrotic members [6,7,12].

LiRecDT6 heterogeneously expressed in *E. coli* was purified to homogeneity by applying just a single step in a Ni²⁺-affinity chromatography. By this approach it was possible to obtain pure enough materials for structural and functional analysis. The circular dichroism spectrum of recombinant isoform 6 suggests a soluble, non-aggregated, non-denatured and folded molecule. Compared to secondary structure percentages estimated using CD from LiRecDT4 and LiRecDT5 [7], the isoform LiRecDT6 share high similarity to LiRecDT4, which triggers closely related biological activity. The functionality of LiRecDT6 was initially demonstrated by its ability to hydrolyze sphingomyelin and cause rabbit dermonecrosis. Biochemical studies demonstrate the sphingomyelinase (phospholipase) activity in a dose dependent way for LiRecDT6, which also strongly suggests that this recombinant toxin is a closely related member of the dermonecrotic toxin family. Recombinant toxin causes noxious responses upon injection in rabbit skin (a macroscopic lesion) with swelling, erythema, ischemia and necrosis. Such results are in agreement with those hypotheses postulated by da Silveira et al. [6,7], in which apparently there is a direct correlation of phospholipase (catalytic activity) of toxins and their dermonecrotic and inflammatory properties. Histological studies of samples collected from macroscopic lesions 24 h after toxin exposure provide evidence for recombinant toxin functionality. Histopathology is very similar between recombinant toxin and whole venom. Histopathological changes including diffuse edema of dermis, proteinaceous exudation and a massive and diffuse collection of inflammatory cells into the dermis are reported in agreement with literature data [4,28,32,33]. Based on the classical properties reported for native dermonecrotic toxin, these results taken together further support the proposed functionality for LiRecDT6.

Finally, our results suggest biological activities of recombinant toxin in platelet aggregation (an event well described for native dermonecrotic toxins, in spite of unknown molecular pathway details; [1,4,34]), and for mice lethality. LiRecDT6 induced platelet aggregation and caused mouse mortality,

Table 1
Effect of whole venom and LiRecDT6 on mice mortality

Lethality (%)	50 μ g			100 μ g		
	8h	16h	24h	8h	16h	24h
Control	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Venom	4/5 (80%)	5/5 (100%)	–	5/5 (100%)	–	–
LiRecDT6	0/5 (0%)	3/5 (60%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	5/5 (100%)	–

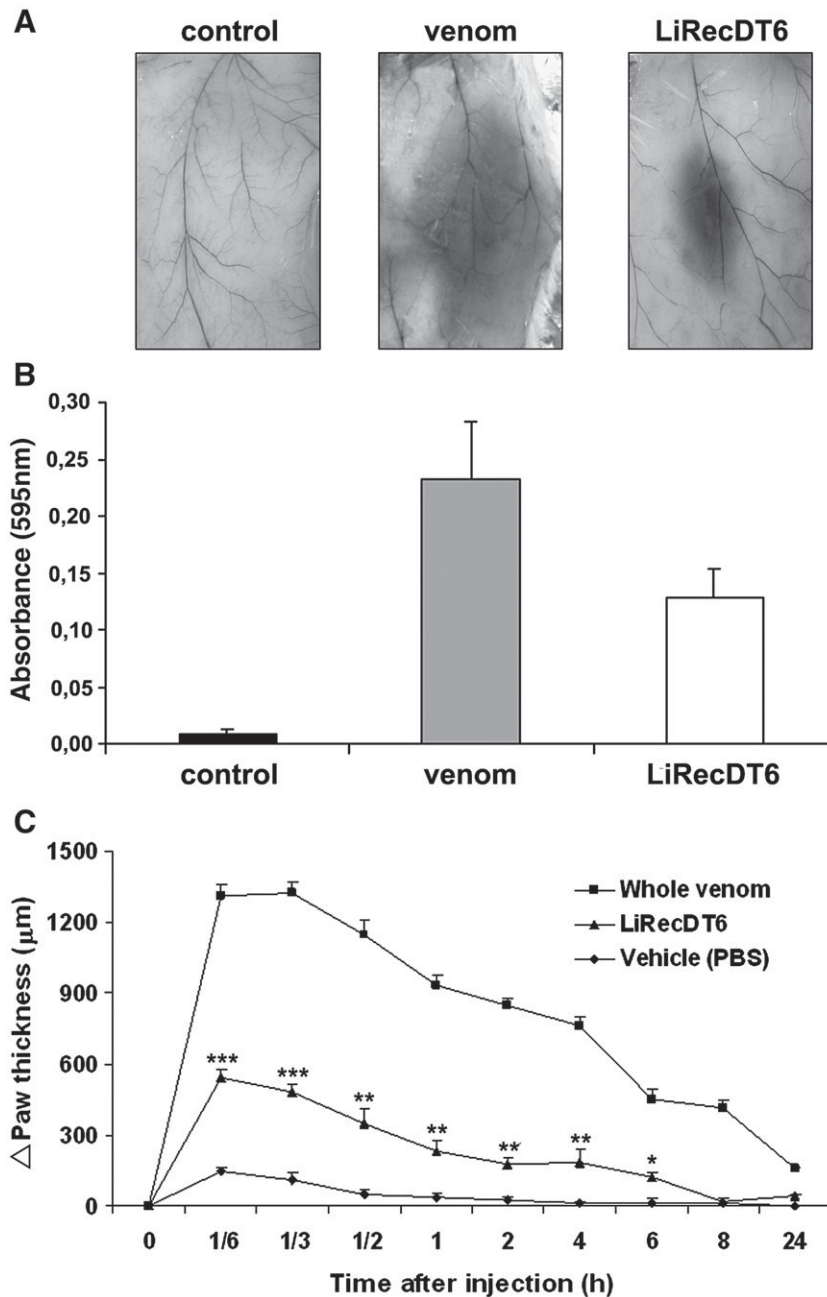


Fig. 7. Effect of recombinant toxin on induction of microvascular permeability of skin vessels and edema. (A) Mice were given intradermal injections (10 µg) of whole venom, LiRecDT6 or PBS (control for baseline permeability level) $n=5$ per treatment. The photographs show dye leakage after envenomation and after recombinant toxin exposure as compared with minimal vessel permeability due to the negative control PBS. (B) Evans blue leakage was determined spectrophotometrically at 595nm. (C) Increase in paw thickness after sc injection of LiRecDT6 and crude venom (10 µg). Each point represents the average \pm standard error ($n=5$). (■) Whole venom, (◆) PBS, (▲) LiRecDT6. Results show an increase in mice footpad thickness induced by toxin treatment, indicating development of edema. The average \pm standard errors are shown, with significance levels $**P<0.01$ and $***P<0.001$ comparing activities of LiRecDT6 and PBS.

corroborating the idea of a dermonecrotic family member isoform and functionality for recombinant toxin.

In agreement with the above discussed results, the functionality for recombinant toxin is supported by its action upon *in vivo* impairment of vascular permeability. LiRecDT6 increased vessel disturbs and permeability of mice skin as well as causing paw edema. From these results, we can apparently speculate on the lack of correlation between dermonecrosis and vascular permeability. Mice do not develop dermonecrosis but

have increased vascular permeability following dermonecrotic toxin exposure. Apparently, by inducing inflammatory response and leukocyte infiltration into the dermis of mice [1,35], dermonecrotic toxins could increase vessel permeability. In addition, a direct toxin effect upon endothelia causing endothelial cell activation and cytotoxicity [26,32,36] could generate increased vessel permeability by causing disturbs of blood vessel walls, as previously discussed by da Silveira et al. [6,7].

The gravitational spreading induced by whole venom, higher edema and diffuse Evans blue permeability after venom exposure compared to more concentrated effects of recombinant toxin (Figs. 5A, 7A and C), suggest the participation of venom spreading factors acting in synergy with dermonecrotic toxins. Some authors speculate that participation of hyaluronidases in the venom plays a role in gravitational spreading [1,4]. Hyaluronidases and proteases have been detected in the venom of many different animals (snakes, caterpillars, scorpions, bees and spiders). These enzymes are apparently spreading factors that act by degrading hyaluronic acid and other extracellular matrix constituents, and then facilitate the diffusion of other venom toxins. Additionally, metalloproteases found in the venom [1,16,37], and now characterized as astacin-like metalloproteases [38] could also be involved in dermonecrotic spreading. These proteases degrade fibronectin, entactin and basement membranes, thereby causing blood vessel instability and venom toxin spreading [39].

Based on crystallographic results obtained with a recombinant dermonecrotic toxin isoform from *L. laeta* venom, structural and sequence alignment comparison data [40], a classification system taking into account their phospholipase D activity was proposed for dermonecrotic toxin isoforms. According to the authors, brown spider venom dermonecrotic toxins can be divided into molecules of class I (those containing just one intrachain disulphide bond and one extended hydrophobic loop), as is the case of the *L. laeta* isoform analyzed, and class II molecules that contain an additional disulphide bond, which links the catalytic loop to a second flexible loop. The class II phospholipases can be subdivided into class IIa and class IIb (according their ability (or lack thereof) to hydrolyze sphingomyelin, respectively). Based on this classification, LiRecDT6 belongs to class IIa since it possesses two putative disulphide bonds and is able to hydrolyze sphingomyelin. Nevertheless, this classification probably should be refined, since it was based just in one crystallographic model (*L. laeta* dermonecrotic toxin) and other additional examples must be examined to confirm the proposed model.

Natural molecules have been used recently to investigate molecular and cellular mechanisms and as models for the design of new drugs or even as diagnostics or therapeutics [41]. The development of recombinant *Loxosceles* venom toxins can provide excellent tools for the study of the inflammatory response of agonist molecules, to design or identify antagonist molecules and even as biological tools for studying LPA and C1P signal cascades involved in several biological events of cells. Also, evaluating toxin platelet aggregating activity with emphasis on the identification of normal or abnormal platelet function, quantitative platelet response and design of antagonist molecules will be feasible with this tool. Finally, recombinant toxins could be used as recombinant antigens for serum therapy applications.

In summary, herein, we have identified a novel *Loxosceles* dermonecrotic toxin member from venom glands. We cloned, heterogeneously expressed and purified this toxin, which has a high functionality for phospholipase activity and dermonecrosis. The recombinant toxin also triggers an inflammatory res-

ponse, platelet aggregation, increased vascular permeability and mice mortality. Together these results will provide insight into loxoscelism and will contribute to further structural, biological understanding and biotechnological applications of this venom toxin family.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPESP, Fundação Araucária-PR, MEC-SESU, Brazil and SETI-PR, Brazil. We are grateful to HEMEPAR-Blood Bank, PR, Brazil, for providing facilities in platelet aggregation assays.

References

- [1] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M.H. Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spider and loxoscelism, *Toxicon* 44 (2004) 693–709.
- [2] C.J. Hogan, K.C. Barbaro, K. Winkel, Loxoscelism: old obstacles, new directions, *Ann. Emerg. Med.* 44 (2004) 608–624.
- [3] D.L. Swanson, R.S. Vetter, Loxoscelism, *Clin. Dermatol.* 24 (2006) 213–221.
- [4] J. Futrell, Loxoscelism, *Am. J. Med. Sci.* 304 (1992) 261–267.
- [5] O.M. Chaim, Y.B. Sade, R.B. da Silveira, L. Toma, E. Kalapothakis, C. Chávez-Olortegui, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (2006) 64–77.
- [6] R.B. 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.
- [7] 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.
- [8] S. Lee, K.R. Lynch, Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA), *Biochem. J.* 391 (2005) 317–323.
- [9] W.H. Moolenaar, L.A. van Meeteren, B.N. Giepmans, The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling, *BioEssays* 26 (2004) 870–881.
- [10] B. Anliker, J. Chun, Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20555–20558.
- [11] R.B. Cunha, K.C. Barbaro, D. Muramatsu, F.C.V. Portaro, W. Fontes, M.V. Sousa, Purification and characterization of Loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom, *J. Protein Chem.* 22 (2003) 135–146.
- [12] L.F. Machado, S. Laugesen, E.D. Botelho, C.A. Ricart, W. Fontes, K.C. Barbaro, P. Roepstorff, M.V. Sousa, Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom, *Proteomics* 5 (2005) 2167–2176.
- [13] B. Ramos-Cerrillo, A. Olvera, G.V. Odell, J. Paniagua-Solis, A. Alagón, R.P. Stock, Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*, *Toxicon* 44 (2004) 507–514.
- [14] 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.
- [15] E. Kalapothakis, S.C. Araujo, C.S. Castro, T.M. Mendes, M.V. Gomez, O.C. Mangili, I.C. Gubert, C. Chavez-Olortegui, Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom, *Toxicon* 40 (2002) 1691–1699.
- [16] L. Feitosa, W. Gremski, S.S. Veiga, M.C.Q.B. Elias, E. Graner, O.C.

- Mangili, R.R. Brentani, Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Toxicon* 36 (1998) 1039–1051.
- [17] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lippman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [18] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- [19] G. Deleage, C. Geourjon, An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from dichroism spectrum, *Comput. Appl. Biosci.* 2 (1993) 197–199.
- [20] C.F.A. Culling, R.T. Allison, W.T. Barr, *Cellular Pathology Technique*, Butterworth & Co, Ltda, London, 1985.
- [21] K. Udaka, Y. Takeuchi, H.Z. Movat, Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133 (1970) 1384–1387.
- [22] J.N. Sharma, A.M. Samud, M.Z. Asmawi, Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice, *Inflammopharmacology* 12 (2004) 89–94.
- [23] M.T. Murakami, M.F. Fernandes-Pedrosa, D.V. Tambourgi, R.K. Arni, Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D, *J. Biol. Chem.* 8 (2005) 13658–13664.
- [24] K.C. Barbaro, M.V. Sousa, L. Morhy, V.R. Eickstedt, I. Mota, Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae), *J. Protein Chem.* 15 (1996) 337–343.
- [25] M.H. Appel, R.B. da Silveira, W. Gremski, S.S. Veiga, Insights into brown spider and loxoscelism, *Invertebr. Surv. J.* 2 (2005) 152–158.
- [26] K.D. Patel, V. Modur, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, The necrotic venom of brown recluse induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 631–642.
- [27] D.M. Elston, J.S. Eggers, W.E. Schmidt, A.B. Storrow, R.H. Doe, D. McGlasson, J.R. Fischer, Histological findings after brown recluse spider envenomation, *Am. J. Dermatopathol.* 22 (2000) 242–246.
- [28] K.Z. Ospedal, M.H. Appel, J.F. Neto, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Int. J. Exp. Pathol.* 83 (2002) 287–294.
- [29] D. Corda, C. Iurisci, C.P. Berrie, Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols, *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 52–69.
- [30] C. Luquain, V.A. Sciorra, A.J. Morris, Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 377–383.
- [31] M.F.F. Pedrosa, I.L.M.J. Azevedo, R.M.G. Andrade, C.W. Berg, C.R.R. Ramos, P.L. Ho, D.V. Tambourgi, Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 638–645.
- [32] S.S. Veiga, V.C. Zanetti, C.R.C. Franco, E.S. Trindade, M.A. Porcionatto, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells, *Thromb. Res.* 102 (2001) 229–237.
- [33] V.C. Zanetti, R.B. da Silveira, J.L. Dreyfuss, J. Haoach, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13 (2002) 135–148.
- [34] S.S. Veiga, L. Feitosa, V.L.P. Santos, G.A. de Souza, A.S. Ribeiro, O.C. Mangili, M.A. Porcionatto, H.B. Nader, C.P. Dietrich, R.R. Brentani, W. Gremski, Effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures, *Histochem. J.* 32 (2000) 397–408.
- [35] C. Sunderkötter, S. Seeliger, F. Schonlau, J. Roth, R. Hallmann, T.A. Luger, C. Sorg, G. Kolde, Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice, *Exp. Dermatol.* 10 (2001) 391–404.
- [36] K.S. Paludo, L.H. Gremski, S.S. Veiga, O.M. Chaim, W. Gremski, D.F. Buchi, H.B. Nader, C.P. Dietrich, C.R.C. Franco, The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures, *Toxicon* 47 (2006) 844–853.
- [37] R.B. da Silveira, J.F.S. Filho, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, H.B. Nader, C.P. Dietrich, Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spider, *Toxicon* 40 (2002) 815–822.
- [38] 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.
- [39] T. Matsui, Y. Fujimura, K. Titani, Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1477 (2000) 146–156.
- [40] M.T. Murakami, M.F. 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.
- [41] N. Aubrey, C. Devaux, E. di Luccio, M. Goyffon, H. Rochat, P. Billiald, A recombinant scFv/streptavidin-binding peptide fusion protein for quantitative determination of the scorpion venom neurotoxin AahI, *Biol. Chem.* 382 (2001) 1621–1628.

Identification of a direct hemolytic effect dependent of catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom.

Daniele Chaves-Moreira^a, Olga M. Chaim^{a,b}, Kátia S. Paludo^{a,c}, Luiza H. Gremski^{a,b}, Juliana de Moura^d, Oldemir C. Mangili^e, Waldemiro Gremski^{a,f}, Andrea Senff-Ribeiro^a, Rafael Bertoni da Silveira^g,
Silvio S. Veiga^{a*}

^aDepartment of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil; ^bDepartment of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cMedical Clinic Discipline, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^dDepartment of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil; ^eDepartment of Physiology, Federal University of Paraná; ^fCatholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil; ^gDepartment of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

*Corresponding author:

Silvio S. Veiga

Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.

Fax: +55 41 3266 2042

E-mail: veigass@ufpr.br

Abstract

Brown spiders have world-wide distribution and accidents that are considered health problem especially in South America are named loxoscelism. Victims followed accidents present necrotic cutaneous lesions surrounding the bites and in a less intensity systemic signs such as renal failure, disseminated intravascular coagulation, and hemolysis. Here, we studied the molecular way by which a purified recombinant toxin from the venom gland, biochemically characterized as phospholipase-D (dermonecrotic toxin), causes hemolysis. Toxin treatment of human blood erythrocytes experimentally induced direct hemolysis in a dose-dependent concentration manner and in a time-dependent way. Erythrocytes exposed to the recombinant phospholipase-D toxin showed morphological changes in size and shape of cells in a time-dependent manner. Also, hemolysis was not dependent of ABO group and Rhesus systems, since human erythrocytes from all blood group treated by recombinant toxin suffered hemolysis in a similar manner. The direct lysis of erythrocytes evoked by recombinant phospholipase-D depends on animal species tested, since erythrocytes from human, rabbit and sheep suffered hemolysis in higher percentage than horse erythrocytes. Confocal microscopy and immunofluorescence assay using antibodies against phospholipase-D, as well as cell cytometry and confocal microscopy using a recombinant fusion GFP-phospholipase-D protein supported the direct binding of toxin to membrane of human erythrocytes. Moreover, erythrocytes treated by recombinant toxin reacted with annexin-V and had their lipid rafts profile altered, supporting for a changing in the phospholipid membrane content of

treated cells exposing negatively charged phosphatidylserine at the cell surface, and for a reorganization of membrane lipid components. Additionally, three divalent ion chelators (EGTA, EDTA and 1,10-phenanthroline), significantly inhibited hemolysis evoked by phospholipase-D (that has magnesium at the catalytic domain), as compared to phenylmethylsulfonyl fluoride a serine protease inhibitor that had no effect upon hemolysis, suggesting catalysis as involved upon hemolysis. Finally, by using a site directed mutated recombinant phospholipase-D at the catalytic domain, substituting histidine at position 12 by alanine, the hemolysis and morphologic changes of erythrocytes were completely inhibited, but not the toxin binding on the erythrocytes surface, supporting that the catalytic activity of enzyme is involved on hemolysis and cellular alterations but not on the toxin cell binding. Thus, results described herein provide evidence that phospholipase-D from *L. intermedia* venom stimulates direct hemolysis upon human blood cells in a catalytic-dependent way.

Key words: Brown spider, venom, phospholipase-D, catalysis, hemolysis.

Introduction

Accidents evoked by brown spiders (*Loxosceles* genus) cause skin injuries characterized by urticarial reaction, edema, erythema, and a necrotic lesion that may spread gravitationally, and systemic manifestations such as malaise, weakness, nausea, headache, myalgia, fever, acute renal failure, disseminated intravascular coagulation, and intravascular hemolysis. Systemic reactions may be seen in a minority of cases, but they can be severe in some patients and occasionally fatal (da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006).

Several case reports have described intravascular hemolysis followed brown spider bites (Murray and Seger, 1994; Williams et al., 1995; Souza et al., 2008). On the other hand, many studies have indicated a hemolytic activity of *Loxosceles* venoms under laboratory conditions upon red blood cells. It seems that there is different susceptibility of animal species to venom-induced hemolysis. Human and swine erythrocytes are more susceptible to lysis than rabbit and guinea pig (Futrell, 1992). The laboratory features observed in victims may include hemoglobinuria, proteinuria and bilirubin in the urine (Williams et al., 1995; Lung and Mallory 2000; Souza et al., 2008). According to some authors, the nephrotoxicity followed brown spider accidents may reflect hematologic disturbances such as intravascular hemolysis and disseminated intravascular coagulation, which may lead to renal failure (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004). The *Loxosceles* venom is crystalline and minute (some microliters). It is enriched in proteic toxins with an electrophoretic protein profile in the regions between 20kDa and 40kDa and both female and male animals trigger noxious effects (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004). The crude venom contains several well biochemically characterized molecules including hyaluronidases (Barbaro et al., 2005; da Silveira et al., 2007a), astacin-like metalloproteases (Feitosa et al., 1998; da Silveira et al., 2007b), low molecular mass insecticidal peptides (de Castro et al., 2004) and phospholipases-D, also named dermonecrotic toxins (Machado et al., 2005; Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006; 2007c; Kalapothakis et al., 2007; Appel et al., 2008).

The dermonecrotic toxin is the best known molecule found in different brown spider venoms. Several studies identified this toxin as contributing to the major deleterious effects of spider bites, including hemolysis (Forrester et al., 1978), platelet aggregation (Kurpiewski et al., 1981), vessel hypermeability (da Silveira et al., 2006), nephrotoxicity (Chaim et al., 2006, Kusma et al., 2008), and the typical dermonecrotic lesions of brown spider bites (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004). This toxin has been found in the venoms of *L. reclusa* (Futrell, 1992), *L. gaucho* (Barbaro et al., 1992), *L. intermedia* (Mota et al., 1995), *L. rufescens* (Barbaro et al., 1996) and *L. laeta* (Cunha et al., 2003) and *L. boneti* (Ramos-Cerrilho et al., 2004), supporting species conservation and biological importance. Previous studies have characterized dermonecrotic toxin as a sphingomyelinase-D molecule based on its activity to hydrolyze sphingomyelin into choline and acylsphingosine phosphate (Futrell, 1992). Nevertheless, based on additional biochemical analysis the term sphingomyelinase-D has been replaced by phospholipase-D to represent a more accurate and broader denomination since the toxin hydrolyzes not only sphingomyelin but also lysoglycerophospholipids to generate ceramide1-phosphate (C1P) or lysophosphatidic acid (LPA) (Lee and Lynch, 2005). Today, by using molecular biology and proteomic techniques, it has been demonstrated that the dermonecrotic toxin (phospholipase-D) is a member of a larger family of related molecules displaying similar molecular masses, amino acid, immunological and biological homologies (Kalapothakis et al., 2007). Studies corroborate and strengthen the idea of the existence of an intraspecies family of phospholipase-D toxins and suggest that the deleterious activities induced by these toxins reflect a synergistic mechanism for different toxin isoforms found in the whole venom.

The mechanism by which the venom causes hemolysis is currently under investigation. This effect is calcium- and complement-dependent but antibody-independent, and hemolysis is induced by native and recombinant phospholipase-D toxins (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Ribeiro et al., 2007). Experiments carried out using human erythrocytes treated with recombinant phospholipase-D toxins obtained from a cDNA library from *L. intermedia* venom gland showed toxins activity, causing hemolysis in a concentration- and time-dependent way (Ribeiro et al., 2007).

Herein, by comparing a wild-type toxin (Chaim et al., 2006) and a site directed mutated at the catalytic domain recombinant phospholipase-D toxin (Kusma et al., 2008), we reported the involvement of the catalytic domain of toxin in a direct hemolytic activity. Such results strengthen the previous data reporting the participation of dermonecrotic toxins in red blood cell lysis and point out for a direct molecular mechanism for this event, dependent of the catalytic activity of phospholipase-D.

Materials and Methods

Reagents

Polyclonal antibodies to whole venom toxins and phospholipase-D toxin were produced in rabbits as described (Luciano et al., 2004; Chaim et al., 2006). Hyperimmune IgGs were purified from serum using a mixture of Protein-A and Protein-G Sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden), as recommended by the manufacturer. Phenylmethylsulfonyl fluoride,

EDTA, EGTA, 1,10-phenanthroline and Fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG were purchased from Sigma, St. Louis, USA. Whole venom from *L. intermedia* was extracted from spiders captured from the wild as described by Feitosa et al. (1998).

Recombinant protein cloning and expression

The venom gland cDNA library was previously built (Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006). GenBank data deposition information for *L. intermedia* cloned LiRecDT1 cDNA is DQ218155. The cDNA corresponding to the mature phospholipase-D LiRecDT1 protein was amplified by PCR. The forward primer used was 30Rec sense (5'-CTCGAGGCAGGTAATCGTCGGCCTATA-3') designed to contain an *Xho* I restriction site (underlined) plus the sequence related to the first seven amino acids of mature protein. The reverse primer used was 30Rec antisense (5' CGGGATCCTTATTTCTTGAATGTCACCCA-3'), which contains a *Bam*H I restriction site (underlined) and the stop codon (bold). The PCR product was cloned into pGEM-T vector (Promega, Madison, USA). The pGEM-T vector containing the mature protein encoding cDNA was then digested with *Xho* I and *Bam*H I restriction enzymes. The excised insert was gel purified using QIAquick Gel 74 Extraction Kit (QIAGEN) and subcloned into pET-14b (Novagen, Madison, USA) digested with the same enzymes. The mutated toxin LiRecDT1 H12A was obtained by Single-tube Megaprimer PCR method which was performed with two rounds of PCR to introduce a site-directed mutagenesis in the LiRecDT1 sequence (Kusma et al., 2008). Briefly, the first round includes the site directed mutagenesis in the first histidine amino acid residue of catalytic domain, by using the reverse primer P1H12A (5'- ATTTACCATGGCCCCCATGATC-3') designed to contain the codon substitute for alanine plus the sequence related to the others original amino acids of mature protein. The recombinant protein LiRecDT1-GFP was obtained by subcloning the previously constructed LiRecDT1 (Chaim et al. 2006) and the sequence of enhanced green fluorescence protein (EGFP) in pET-14b, following a Blunt-Cut-Cut strategy at *Nde*I site of pET-14b and two *Bam*H I sites (between LiRecDT1, EGFP and the vector). The resulting construct was a fusion protein with a 6x His-Tag at the N-terminus, the sequence of mature LiRecDT1 and EGFP at the C-terminus. All recombinant constructs (LiRecDT1, LiRecDT1 H12A, LiRecDT1-GFP) were expressed as fusion proteins, with a 6x His-Tag at the N terminus and a 13 amino acid linker including a thrombin site between the 6x His-Tag and the mature protein (N-terminal amino acid sequence before the mature protein: MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLE). pET-14b/ *L. intermedia* cDNA constructs were transformed into One Shot *E. coli* BL21(DE3)pLysS competent cells (Invitrogen) and plated on LB agar plates containing 100µg/ml ampicillin and 34µg/mL chloramphenicol. A single colony was inoculated into 50ml LB broth (100µg/mL ampicillin and 34µg/mL chloramphenicol) and grown overnight at 37°C. A 10mL portion of this overnight culture was grown in 1L LB broth/ampicillin/chloramphenicol at 37°C until the OD at 550nm reached 0.5. IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) was added to a final concentration of 0,05mM and the culture was induced by the incubation for additional 3.5 hour at 30°C (with vigorous shaking). Cells were harvested by centrifugation (4,000xg, 7min) and the pellet was frozen at -20°C overnight.

Recombinant proteins purification

Cell suspensions were thawed and additionally disrupted by 6 cycles of 10 seconds sonication at low intensity. Lysed materials were centrifuged (20,000xg, 20 minutes) and the supernatants were incubated with 1mL Ni²⁺-NTA agarose beads for 1hour at 4°C (with gentle agitation). The suspensions were loaded into a column and the packed gel was exhaustively washed with the appropriate buffer (50mM sodium phosphate pH 8.0, 500mM NaCl, 20mM imidazole) until the OD at 280nm reached 0.01. Recombinant proteins were eluted with 10mL of elution buffer (50mM sodium phosphate pH 8.0, 500mM NaCl, 250mM imidazole) and 1mL fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions. Fractions were pooled and dialyzed against phosphate buffered saline (PBS).

Erythrocytes

Adult rabbits weighing approximately 3kg from the Central Animal House of the Federal University of Paraná, were used for blood collection and erythrocyte preparation. Sheep erythrocytes were purchased from Newprov (Pinhais, PR, Brazil). Horse erythrocytes were obtained from adult animals of Jockey Club (Curitiba, PR, Brazil). Human erythrocytes were obtained from normal donors. All experimental protocols using animals were performed according to the "Principles of laboratory animal care" (NIH Publication n° 85-23, revised 1985) and "Brazilian Federal Laws", and ethical committee agreement number 245 of Federal University of Paraná. In the case of human blood collection procedure was authorized by ethical committee agreement of Federal University of Paraná.

Preparation of erythrocytes

After blood harvested with acid EDTA K₂ 5% and a 21-gauge needle (BD Plastipak) on the day of each experiment, platelet-rich plasma and buffy coat were removed by aspiration after centrifugation at 200g for 15 min. Packed erythrocytes were washed 3 times with Ringer Solution for morphological observations (125mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 32mM HEPES, 5mM glucose, 1mM CaCl₂, pH 7.4, 300 mOsm/kg H₂O) or Tris buffer Sucrose (TBS) for hemolysis assays (250mM sucrose, 10mM Tris/HCl, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O). Washed erythrocytes were resuspended in the appropriated buffer to 5x10⁸ cells/mL.

Determination of hemolytic activity

The hemolysis assay was performed as described by Harris and Phoenix (1997). Washed red blood cells (10⁸ cells) were added to each Eppendorf tube containing the appropriate concentration of venom/toxin in TBS buffer (serial dilution ranging from 0.025, 0.25, 2.5 and 25µg/mL). At this assay samples were performed in pentaplicate and there was a Negative Control (in presence of appropriate amount of TBS only) and a Positive Control (red blood cells in distilled water and 0.1% (v/v) Triton X-100). After 24 hours of incubation with gentle agitation, controls and samples were centrifuged (microfuge refrigerate Eppendorf) for 3 min at 1600 rpm, and the absorbances of supernatants were read immediately at 540nm (Meridian, ELx 800, Auto Reader Diagnostics inc, USA). Absorbance values were converted to percent hemolysis using as 100% lysis the absorbance values of positive control. All the hemolytic activity assays performed in this work

were done following the protocol described above. In order to evaluate time course of hemolysis a series of experiments were performed with selected concentration (25µg/mL) of LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A. The entire assay was carried out with normal TBS and tested against a normal osmolarity control (without toxin) in pentaplicate over five different times (0, 4, 8, 16, 24 hours). Supernatants were processed at each time interval as described above.

Observation using light microscopy

Morphological examination of human erythrocytes treated with whole venom (5 µg/mL), recombinant toxin LiRecDT1 (5 µg/mL), and recombinant mutated toxin LiRecDT1 H12A (25 µg/mL) for 0, 4, 8, 16 and 24 hours were fixed with 1% glutaraldehyde and prepared as described by Udden (2005) and then observed at light microscope (Leica-DMIL, Wetzlar, Germany). Control cells were incubated with Ringer Solution. Photomicrographs correspond to digital images (6.1 megapixels, Cybershot Sony) of cells originally magnified at 400x.

Observation using scanning electron microscopy

Ultrastructural analysis of erythrocytes was performed according to Chung et al. (2007). After 8 hours treatment with 5µg/mL whole venom, LiRecDT1 and 25µg/mL LiRecDT1 H12A, cells were washed with Ringer Solution. Control cells were only erythrocytes and Ringer Solution. The process of fixation was with 2% glutaraldehyde solution for 1 hour at 4°C, the erythrocytes were attached onto coverslip coated with poly-*l*-lysine at room temperature for 30 min. The coverslip was rinsed with Ringer Solution, dried at room temperature and sputter-coated with gold. Coverslips were observed on scanning electron microscope (JEOL, Japan).

Flow Cytometry

Human erythrocytes were incubated for 24 hours with 25µg/mL of whole venom, LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A. The cell suspensions were analyzed for erythrocytes count and size distributions using Flow Cytometer (FACS-CALIBUR, Becton Dickinson, New Jersey, USA). Control cells (with only Ringer Solution) were used for comparison. Analysis of LiRecDT1-GFP treatment was also evaluated at flow cytometer: washed erythrocytes (5×10^6 cells) were incubated with 25µg/mL of fluorescent recombinant toxin (24 hours, 37°C) in a total volume of 400µL of Ringer Solution. The samples were then diluted to 1mL in Ringer Solution and light scatter and fluorescence channels were analyzed. Background fluorescence (cell and buffer) and unspecific binding of GFP to erythrocytes were evaluated and acquisition was gated considering these data.

Phosphatidylserine exposure

Annexin-V-FITC (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) binding experiments were performed as described by Wood et al. (1996) using a flow cytometer (FACS-CALIBUR, Becton Dickinson). Human erythrocytes were incubated for 4 hours with 25µg/mL of whole venom, LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A. Control cells were treated only with Ringer Solution. Erythrocytes were diluted (5×10^6) to a final volume of 0.5mL in an annexin-V binding buffer, pH 7.4 (containing 10mM HEPES, 136mM NaCl, 2.7mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM NaH₂PO₄, 5mM glucose, 5mg/ml BSA and 2.5mM CaCl₂). Annexin-V- FITC was added to a concentration of 0.1µM to the red blood cells and samples

were incubated for 15 min at room temperature in the dark. After incubation, an aliquot of the sample was taken for flow cytometric analysis, cells were analyzed by forward scatter and Annexin-V fluorescence intensity was measured in fluorescence channel FL-1 with an excitation wavelength of 488nm and an emission wavelength of 530nm. The percentage of Annexin-V positive cells and their mean fluorescence intensity (in arbitrary units) were calculated using CellQuest software attached with the flow cytometer. Data from 100.000 events were collected and analyzed.

Immunofluorescence

Peripheral blood (1mL) was washed and diluted in Ringer Solution containing 10mM glucose and 1mg/mL BSA, pH 7.4. BSA was used in order to preserve the biconcave shape of normal erythrocytes. This assay was performed according to Kalfa et al. (2006). Erythrocytes were incubated with whole venom, LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A for 8 hours (25µg/mL) and 100µL of the cell suspension were applied onto a poly-*l*-lysine coated coverslip for adhesion. This procedure allows cells while attached on coverslips, minimizing modification of the cell shape with repeated centrifugations. Unbound cells were removed by washing with Ringer Solution and fixation of adhered blood cells on coverslips with 0.1% glutaraldehyde in Ringer Solution (10mM glucose, 1mg/mL BSA, pH 7.4) for 20 min at 4°C. To ensure complete neutralization of unreacted aldehydes, cells were then incubated in blocked buffer at room temperature for 1 hour. Before incubation with antibodies unspecific binding sites were blocked by incubation of coverslips in blocking buffer (Ringer Solution containing 10mM glucose and 1mg/mL BSA, 0,1M glycine, 5% serum fetal bovine, and 0.05% sodium azide) for 1 hour. The samples were stained for toxins using indirect immunofluorescence with antibodies at 1:1000 dilution (anti-venom and anti-LiRecDT1) by incubation for 2 hours. After buffer washing, slides were incubated for 1 hour with secondary FITC 488-conjugated anti-rabbit IgG (1:500). Coverslips were mounted to glass slides using Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Samples were observed using a confocal laser-scanning microscope Radiance 2100 (BIO-RAD), coupled to a Nikon-Eclipse E800 with Plan-Apochromatic objectives (Sciences and Technologies Group Instruments Division) and spatial distribution of the fluorescent probes was analyzed.

Lipid raft analysis of toxin-treated erythrocytes

For localization of lipid rafts on erythrocyte cell surface, Vybrant Alexa-Fluor 594 Lipid Raft Labeling Kit was used as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Briefly, red blood cells treated with (25µg/mL) whole venom and recombinant toxins for 8 hours at 37°C or control cells (absence of toxins) were incubated with Cholera toxin subunit B (CT-B) for 10 min at 4°C. The cells were then gently washed three times with chilled Ringer Solution containing 10mM glucose and 1mg/mL BSA, pH 7.4. Crosslinking of CT-B labeled lipid rafts was performed with chilled anti-CT-B antibody (1:200 dilution) for 15 min at 4°C. Cells were washed, fixed and blocked as described above for immunofluorescence. The samples were visualized using a fluorescence confocal microscope (Confocal Radiance 2100, BioRad) coupled to a Nikon-Eclipse E800 with Plan-Apochromatic objectives (Sciences and Technologies Group Instruments Division).

Effect of enzymatic inhibitors

The recombinant toxin LiRecDT1 (25µg/mL) was incubated with 1mM EDTA, or 1mM EGTA, or 1mM 1,10-phenanthroline, or 1mM PMSF or toxin alone for 30 minutes on ice. A control without toxin (with TBS only) was also performed. Washed erythrocytes were added and incubated for 24 hours at 37°C with gentle agitation. Supernatants were read at each time interval as described above.

Statistical analysis

Statistical analyses of hemolytic assays were performed using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for average comparisons GraphPad InStat program version 3.00 for Windows 2000. Mean \pm S.E.M. values were used. Significance was determined as $p \leq 0.05$.

Results

Direct hemolysis induced by recombinant phospholipase-D from brown spider venom

It is known that brown spider venom induces hemolysis in accidented patients and experimental animal models exposed to the venom. Such a venom activity is attributed to native dermonecrotic toxins that when purified from whole venom can reproduce this effect in a serum complement-dependent way (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). Herein, we have additional data pointing for a direct hemolysis activity caused by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) expressed as a recombinant toxin from a cDNA library of venom gland of *Loxosceles intermedia* (Chaim et al., 2006). Figure 1A depicts hemolysis of human red blood cells incubated in a serum free medium and with different concentrations of toxin at 37°C. As observed, there is hemolysis in a dose-dependent concentration manner. Additionally, as shown in figure 1B experiments were performed in different time of exposition to recombinant toxin. Hemolysis is evident in a time-dependent way. As shown, the above mentioned results supported for a direct hemolytic activity of phospholipase-D toxin upon human erythrocytes.

Morphological alterations of human erythrocytes induced by recombinant phospholipase-D

To ascertain cytotoxicity and the direct hemolytic effect evoked by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) of *Loxosceles* spider venom as described above, human erythrocytes were exposed to recombinant toxin in different times and cells were analyzed through an inverted microscope. As depicted in figure 2A, there were morphological changes of erythrocytes exposed to toxin compared to negative control. Findings included mainly alterations in size and shape of cells in a concentration and time-dependent manner. Poikilocytosis of erythrocytes treated by toxin included changes from biconcave disks flattened and depressed in the center as shown by control group, to spherical and rounded cells. Additionally, erythrocytes exposed to toxin were scanned through electron microscope and changes observed. Figure 2B points for detected alterations. Toxin treatment of erythrocytes led to the appearance of spherocyte, spherostomatocyte and knizocyte forms, accompanied by a cell size decrease in a time-dependent manner. Finally, erythrocytes were examined by flow cytometry showing FSC ("forward scatter") and 90° SSC ("side scatter") after 24h

of incubation with 25 µg/mL of recombinant toxin. As depicted in figure 2C, toxin treatment induced a cell lysis and debris formation and strengthened the idea of a direct toxin hemolytic activity.

The hemolytic activity of brown spider phospholipase-D is not dependent of ABO blood group or Rhesus systems

With the goal to confirm noxious effects followed phospholipase-D treatment of erythrocytes, we next evaluated the involvement of ABO blood antigens and Rhesus system on the hemolytic effect evoked by toxin, objectivating to describe some putative factor that could facilitate this event. Washed human erythrocytes from donors classified as A, B, and O groups, as well as Rh (+) and Rh (-), were exposed to recombinant toxin and evaluated for hemolysis. As shown in figure 3, hemolysis induced by phospholipase-D was not dependent neither of ABO group antigens nor Rhesus system. Erythrocytes from all blood group tested suffered hemolysis in a similar percentage supporting that hemolysis triggered by brown spider venom phospholipase-D was not dependent of factors linked to ABO markers or Rhesus system. These findings together with cytotoxicity upon human erythrocytes as described above supported the idea of a direct phospholipase-D hemolytic activity.

The direct lysis of erythrocytes caused by phospholipase-D depends on the animal species evaluated

With the objective to corroborate the above described results we next analyzed the direct hemolytic activity of recombinant phospholipase-D upon washed red blood cells from different animal species. Washed erythrocytes from human, rabbit, sheep and horse were exposed to purified recombinant phospholipase-D and studied for lyses. As depicted in figure 4, erythrocytes from different animal species did not suffer hemolysis induced by phospholipase in a similar way. It seems that there is a different susceptibility of red blood cells to enzyme. Erythrocytes from sheep, human and rabbit were lysed in a high percentage compared to cells from horse that apparently is more resistant to lysis. These data confirmed the above described results that phospholipase-D is capable of direct lysis of erythrocytes and suggested the idea of membrane constituents playing a role on such venom phospholipase-D activity, since cytoplasmic membranes from erythrocytes of different species have differences for lipid composition.

Evidence that recombinant phospholipase-D binds on human red blood cell membrane

With the purpose to demonstrate that there are sites of attachment of phospholipase-D on erythrocyte membrane, and based on the fact that enzyme is also a sphingomyelinase, which putatively could bind to sphingomyelin, an erythrocyte outside membrane phospholipid constituent, we investigated human erythrocytes treated with phospholipase-D by an immunofluorescence reaction using an antibody, which reacts with the phospholipase-D. As shown in figure 5A, the antibody reaction produced a positive signal in erythrocytes. Additionally, washed erythrocytes were incubated with a recombinant fusion toxin GFP-LiRecDT1, using GFP alone as negative control. Cells were evaluated by flow cytometry. As depicted in figure 5B, recombinant fusion toxin bound to erythrocytes compared to GFP alone that was negative. Additionally, human erythrocytes were treated by GFP-LiRecDT1 and visualized by confocal microscopy (fig.5C). Results supported the

direct binding of phospholipase-D to membrane of human erythrocytes and open the possibility for an enzyme catalytic domain-dependent manner of hemolysis.

Toxin binding on the erythrocyte surface stimulates cytoplasmic membrane lipid reorganization

Once detected the binding of toxin on the surface of erythrocytes, we next analyzed the direct activity of phospholipase-D toxin upon lipid organization of cytoplasmic membrane. For this purpose, washed erythrocytes treated by recombinant toxin were incubated with annexin-V and analyzed by flow cytometry. As evidenced by figure 6A, erythrocytes followed toxin treatment were positive for the binding of annexin-V suggesting the exposition of negatively charged phosphatidylserine at the cell surface, and for a reorganization of membrane lipid components. Moreover, venom phospholipase-D-treated erythrocytes were incubated with cholera toxin B subunit (a lipid raft marker), and evaluated through confocal microscopy. As shown by figure 6B, results evidenced a reorganization of rafts followed phospholipase-D toxin exposure, apparently inducing an aggregation of lipid rafts.

The catalytic activity of phospholipase-D plays a role on the hemolysis

To ascertain the mechanism by which phospholipase-D (dermonecrotic toxin) of *Loxosceles* spider venom, triggers its noxious effects upon erythrocytes and further to analyze the involvement of catalytic activity of this enzyme (dependent of Magnesium ion coordination at the catalytic site) (Murakami et al., 2006), human erythrocytes were exposed to recombinant toxin in the presence of different inhibitors such as phenylmethylsulfonyl fluoride, 1,10-phenanthroline, EDTA and EGTA and then analyzed for hemolysis. As depicted in figure 7A, all three divalent ion chelators (EGTA, EDTA and 1,10-phenanthroline), significantly inhibited hemolysis evoked by phospholipase-D compared to phenylmethylsulfonyl fluoride that is a serine protease inhibitor and had no effect upon hemolysis. EDTA that has a higher affinity for Magnesium ion, inhibited hemolysis more efficiently compared to other divalent metal chelators. Additionally, we incubated human erythrocytes in the presence of recombinant toxin (wild-type) or a mutated isoform with a site directed mutagenesis at the catalytic domain, substituting a histidine residue at position 12 for an alanine residue (LiRecDTH12A) (Kusma et al., 2008). As shown in figure 7B, mutated toxin did not cause a significant hemolysis compared to wild-type molecule, as well as, did not induce morphological changes upon washed erythrocytes (figure 7C and 7D), despite its ability of binding erythrocytes (figure 7E), and strengthened the idea of a directed phospholipase-D hemolytic activity dependent on the catalytic activity of toxin.

Discussion

Accidents involving Brown spiders are commonly associated with dermonecrosis, gravitational spreading and a massive inflammatory response at the bite site; along with systemic disturbs, which may include renal failure and hematological disturbances, with special emphasis intravascular hemolysis, thrombocytopenia and disseminated intravascular coagulation (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). The mechanism by which the venom exerts intravascular hemolysis is currently under investigation. Although systemic signs represent a minority of cases, the lysing of erythrocytes evoked by brown spider venom is

especially relevant taking in account that the most serious systemic reactions followed accidents are related to intravascular hemolysis (Futrell, 1992, da Silveira et al., 2004).

The serum complement system has long been described to participate of hemolysis induced by brown spider venom. It seems that spider envenomation induces activation of alternative complement pathway facilitating complement-mediated hemolysis (Futrell, 1992, da Silva et al., 2004, Swanson and Vetter, 2006).

The Hemolytic effect induced by *Loxosceles* spiders venom is demonstrated based on the clinical and laboratory features observed in accidented victims, which can include elevated creatine kinase levels, hematuria, hemoglobinuria, proteinuria and shock (Williams et al., 1995; Bey et al., 1997; Lung and Mallory, 2000; França et al., 2002). Additionally, nephrotoxicity is supported by animal experimental protocols, which comproved clinical data from accidented patients and pointed renal lesions followed venom exposure (Luciano et al., 2004) and a direct nephrotoxicity evoked by the dermonecrotic (phospholipase-D) toxin (Chaim et al., 2006).

Previous studies have characterized dermonecrotic toxin as a sphingomyelinase-D molecule based on its activity to hydrolyze the phospholipid sphingomyelin into choline and acylsphingosine-phosphate (Futrell, 1992). Nevertheless, based on lipid biochemical analysis the term sphingomyelinase-D has been replaced by phospholipase-D to represent a more accurate and broader denomination since the toxin hydrolyzes not only sphingophospholipids, but also glycerophospholipids to generate ceramide-1-phosphate (S1P) or lysophosphatidic acid (LPA) (Lee and Lynch, 2005). It is postulated that by hydrolyzing phospholipids that generate ceramide-1-phosphate or lysophosphatidic acid, the dermonecrotic toxin activates signaling pathways in different cells causing pathophysiological changes such as inflammatory response, platelet aggregation, and increased blood vessel permeability (Anliker et al., 2004; Moolenaar et a., 2004; Lee and Lynch, 2005).

The previous denomination of dermonecrotic toxin today has been changed to the idea of a family of related toxins. A family of resembling molecules for dermonecrotic toxins was first suggested based on a biochemical characterization of a native toxin from *L. reclusa* venom in which four toxins were described (Futrell, 1992). Immunological studies found antigenic cross-reactivity for dermonecrotic toxins from different brown spider venoms, including *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia* (Barbaro et al., 1996). Additionally, immunological and biochemical analyses of *L. reclusa* and *L. deserta* venom showed antigenic cross-reactivity and biochemical homologies (amino acid composition) for dermonecrotic toxins (Gomes et al., 2001). Also, two phospholipase-like toxins were described in *L. gaucho* (Cunha et al., 2003) and four in *L. boneti* venom (Ramos-Cerrillo et al., 2004). Through proteomic studies dermonecrotic toxins have been identified in *L. gaucho* venom (Machado et al., 2005), thereby supporting the idea of a toxin family. Finally, through molecular biology studies this concept was further support by the cloning and expression of phospholipase-D toxins from a variety of *Loxosceles* spiders. Binford et al. (2005) reported three cDNA sequences for phospholipases in *L. arizonica*. Chaim et al. (2006) and da Silveira et al. (2006, 2007b, Appel et al., 2008) using a cDNA library obtained from the venom gland of *L. intermedia*, cloned expressed and reported differential functionality for sex related toxins classified as phospholipase-D. Today, a family of similar phospholipases is recognized and the noxious effects induced by *Loxosceles* whole venom putatively represent a family adding of effects among these toxins (Kalapothakis et al., 2007).

In this study, by using two recombinant isoforms of the phospholipase-D toxin from *L. intermedia* venom gland, a wild-type molecule and a single amino acid mutated H12A at the catalytic site of toxin (Murakami et al., 2006), we have experimental data that supports the direct involvement of phospholipase-D activity upon hemolytic activity evoked by brown spider venom. Our first results demonstrated a direct hemolytic effect of wild-type recombinant phospholipase-D upon human erythrocytes. Toxin-dependent hemolysis occurs in concentration and time-dependent manner, supporting the specificity of reaction. Toxin cytotoxicity was additionally improved by changes of erythrocytes over time followed toxin exposure observed by inverted microscope, and scanning electron microscope, and cell cytometry, which included poikilocytosis and anisocytosis. Moreover, the hemolysis observed after toxin exposure of human red blood cells is not dependent of ABO or Rhesus systems, since washed erythrocytes of group A, B, O and Rh positive or negative were lysed in a similar way followed toxin treatment, supporting that this reaction did not depend of a blood group compatibility. Nevertheless, the direct hemolysis is dependent of animal species since human, sheep and rabbit erythrocytes were lysed followed wild-type toxin exposure, but erythrocytes of horse were less lysed after toxin treatment. These results suggested that cell surface constituents regulate the susceptibility of erythrocytes to phospholipase-D lysis, since erythrocytes from different animal species have the extracellular lipoprotein monolayer composition different compared among themselves. Interestingly, the concentration of sphingomyelin (a putative substrate for venom phospholipase-D), as discussed above, differs in the erythrocytes of these four tested animals. Lipid analyses of red blood cells pointed 19,5% of sphingomyelin to human cells (Ingraham et al., 1981), 50% to sheep (Ochi et al., 2004) and 20% to rabbit (Ochi et al., 2003), animals such erythrocytes were more susceptible to a phospholipase-dependent lysis, compared to erythrocytes of horse (less susceptible) that has 14% of sphingomyelin (Ochi et al., 2003).

By confocal immunofluorescence microscopy using antibodies to phospholipase-D toxin (da Silveira et al., 2006), we were able to detect a toxin interaction with human erythrocyte cell surface. This result demonstrated the existence of sites of attachment for phospholipase toxin on human erythrocyte cell membrane and supported that morphological, and structural changes, as well as hemolysis induced by toxin occur as result of toxin binding to erythrocyte membranes as an early step of process. Additionally, the interaction of venom phospholipase-D with erythrocyte cell membrane was supported by changes in the phospholipids content as shown by the binding of annexin-V followed toxin treatment, what indicated the exposition of phosphatidylserine, a negatively charged and an inner monolayer molecule that after phospholipase-D exposure changes to erythrocyte outside surface, and lipid plasma membrane reorganization as visualized by Cholera toxin B binding. It was already shown that increases at ceramide level following sphingomyelinase activation is one of the mechanisms that brings to PS exposure in erythrocytes (Lang et al., 2005).

We next evaluated protein inhibitor molecules upon toxin-dependent hemolysis and identified that divalent metal chelators such as EDTA, EGTA and 1, 10-phenanthroline efficiently inhibited human blood cell lysis, but phenylmethylsulfonyl fluoride that is a serine protease inhibitor did blocked erythrocyte lysis. These results supported that a divalent metal ion is necessary for biological activity of toxin on hemolysis and is in agreement with literature data, which points that phospholipase-D of brown spider venom contains as a catalytic domain a Magnesium coordination site that plays an essential role on enzyme catalysis (Murakami et al., 2006). This is interesting

because EDTA that has the greatest affinity by Magnesium ion compared to other tested chelators was more efficient on hemolysis inhibition. Together, these above described findings suggested that the catalytic activity of phospholipase-D plays an essential role upon the direct hemolysis induced by this toxin.

The involvement of catalytic site of venom phospholipase-D toxin on hemolysis was finally proved by using a site directed mutated isoform of phospholipase-D at the catalytic domain, where a histidine (a basic and positive charged amino acid) at position 12 was replaced by a residue of alanine (non polar amino acid) (Murakami et al., 2006, da Silveira et al., 2006). Human red blood cells treated with mutated toxin (even at the higher concentration used for wild-type molecule), and over time, showed no hemolysis and just a residual activity upon morphological changes of erythrocyte cell membrane. Likewise, the mutation on toxin also blocked de sphingomyelinase-D activity of this enzyme, demonstrating that sphingomyelin molecules on the cell surface of erythrocytes are involved on lysis of cells and additionally improving the involvement of catalytic domain for phospholipase activity as playing a role on direct hemolysis. The evidence showed here that LiRecDT1 H12A can interact with erythrocyte membrane, but this does not result on morphological changes are in agreement with our previous results by using biopsies of kidney and renal cells (Kusma et al., 2008), and strongly suggests that the catalytic activity of this enzyme, and not its interaction with cell membrane, is essential to the hemolytic effect observed here. Mutated toxin treatments of erythrocytes do not changed lipid organization as visualized by annexin-V or Cholera toxin B binding (data not shown).

What is the mechanism by which phospholipase-D toxins from brown spider venom cause direct hemolysis of cells? We postulate that the direct correlation between phospholipase-D activity and hemolysis can be speculated by the fact that brown spider venom phospholipases can generate ceramide-1-phosphate that is known to induce several pathological responses, including inflammation and platelet aggregation (Anliker et al., 2004; Moolenaar et al., 2004; Lee and Lynch, 2005). Additionally, It has been reported that ceramide is deamidated to sphingosine by endogenous ceramidase, and sphingosine is phosphorylated to sphingosine-1phosphate by endogenous sphingosine kinase (Ohanian and Ohanian, 2001; Eyster et al., 2007). Thus, by generating lipid mediators from red blood cells, venom phospholipase-D stimulates structural changes of cytoplasmic membrane (such as exposition of negatively charged phospholipids as phosphatidylethanolamine), and then rendering cell membranes more open to physiological stress, finally contributing to hemolysis. In addition, such as lipid mediators generated by the action of venom phospholipase-D upon cell membranes can directly bind to human red cell membranes (literature has been described several cell membrane receptors for ceramide and ceramide-1-phosphate involved on cellular metabolism and pathophysiological events, see Anliker et al., 2004; Moolenaar et al., 2004), causing noxious effects on cells, which finally will evoke lysis. *Clostridium perfringens* α -toxin, which exhibits phospholipase C (PLC) and sphingomyelinase (SMase) activities have already been studied as a hemolytic agent (Sakurai et al., 2004). This PLC induced hemolysis of sheep erythrocytes and this activity is linked to the activation of sphingomyelin metabolism, especially the formation of sphingosine-1phosphate (Ochi et al., 2004). It was recently shown that hemolysis caused by α -toxin has the participation of an endogenous sphingomyelinase (ODA et al., 2008).

Many of the morphological alterations observed herein as cell shrinkage, membrane blebbing, and phosphatidylserine exposure at the outer membrane leaflet are characteristic of suicidal death of erythrocytes (eryptosis), (Lang et al., 2005). One of the established signaling pathways that converge to trigger eryptosis is the phospholipase A₂-mediated release of platelet-activating factor that activates a sphingomyelinase leading to formation of ceramide. The enhanced ceramide levels, associated with increased cytosolic Ca²⁺ lead to membrane scrambling with subsequent phosphatidylserine exposure (Lang et al., 2007). We can postulate that ceramide resulted from the venom/toxin activity on erythrocyte membrane sphingomyelin lead to phosphatidylserine exposure. This suggestion is supported on a recent work that shows the vertical movement of ceramide from the outer to the inner leaflet membrane. This ceramide was generated by using an exogenous bacterial sphingomyelinase that hydrolyses sphingomyelin at cell surface (Mitsutake and Igarashi, 2007).

Based on the above described results we can not rule out the serum complement system as playing a role in hemolytic activity of brown spider venom phospholipase-D as previously described by literature data (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). Instead of this, it is rational to speculate that the direct hemolytic effect induced by phospholipase together with complement-dependent hemolysis represent a synergism for a same noxious event described followed accidents with brown spider.

Data described herein indicates the participation of catalytic activity of phospholipase-D from brown spider venom playing a role on the direct hemolytic activity of this toxin, brings insights into loxoscelism and offers contribution on the possibility of a therapy based on inhibition of catalysis of phospholipase toxin.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq and CAPES-Brazil.

Legends

Figure 1. Recombinant phospholipase-D from brown spider venom induces a direct hemolysis upon human erythrocytes. (A) Human erythrocytes suspended in TBS (Sucrose 250 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7.4) were incubated with different concentrations of *L. intermedia* crude venom, or with a recombinant venom phospholipase-D, or in the absence of venom toxins (negative control), for 24 hours, at 37°C. Absorbances of supernatants were read at 550nm and percentage of hemolysis was determined using as 100% of hemolysis the absorbance values induced by distilled water (positive control). Results represent averages of five experiments ± S.E.M. p≤ 00,5. (B) Erythrocytes were incubated with 25µg/mL of whole venom, or recombinant phospholipase-D, or in the absence of toxins (negative control) over five different times (0, 4, 8, 16 and 24hours), and hemolysis was determined under the same conditions as described above. Results represent averages of five experiments ± S.E.M. p≤ 00,5.

Figure 2. Recombinant phospholipase-D treatment of human erythrocytes causes morphological alterations of cells. (A) Human erythrocytes suspended in Ringer Solution (125mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 32mM HEPES, 5mM glucose, 1mM CaCl₂, pH 7.4) were incubated with 5µg/mL of *L. intermedia* crude venom, or recombinant phospholipase-D, or in the absence of toxins (control) for different times (0, 4, 8, 16, 24hours) and then observed in an inverted microscope. Following venom or recombinant toxin treatments there are morphological changes of erythrocytes in a time exposure manner. Changes include the appearance of spherical and rounded cells (arrows point to stomatocytes-like cells and arrow-heads show spherocytes-like cells), compared to control cells that are biconcave disks flattened and depressed in the center. Scale bars were shown in the left of figure. (B) Additionally, cells exposed to 5µg/mL venom or recombinant toxin were observed through scanning electron microscopy. Venom or recombinant toxin treatments of erythrocytes led to the appearance of spherocytes (arrow-heads), and spherostomatocytes (asterisks), and knizocytes (arrow) accompanied by a cell size decrease. Scale bars were shown in the left of figure. (C) Washed erythrocytes were exposed to crude venom or recombinant phospholipase-D (25 µg/mL) and analyzed by flow cytometry to measure cell size and internal complexity through forward angle (FSC) and 90° side angle (SSC) light scatters. Two gates were created in the dot plots to distinguish intact cells (right gate) from lysed cells or debris (left gate). Analyses were performed after 24 hours following toxins exposure. The number of cells with decreased size, lysed cells or debris following venom or toxin treatments visibly increased. Control cells were analyzed in the absence of toxins. The figure shows a representative of three trials.

Figure 3. Hemolysis caused by brown spider phospholipase-D is not dependent of ABO blood group or Rhesus systems. Washed human erythrocytes from donors classified as A, B, and O groups, as well as Rh (+) and Rh (-), suspended in TBS (Sucrose 250 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7.4), were exposed to 25µg/mL of recombinant phospholipase-D, for 24 hours, at 37°C and evaluated for hemolysis. Results represent averages of five experiments ± S.E.M. $p \leq 0.05$.

Figure 4. Hemolysis caused by brown spider recombinant phospholipase-D depends on the animal species evaluated. Washed erythrocytes from sheep, rabbit, human, and horse, suspended in TBS (Sucrose 250 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7.4), were exposed to 25µg/mL of recombinant phospholipase-D, for 24 hours, at 37°C and evaluated for hemolysis. Results represent averages of five experiments ± S.E.M. $p \leq 0.05$.

Figure 5. Brown spider venom recombinant phospholipase-D binds on human red blood cell membrane. (A) Confocal microscopy analysis of human erythrocytes followed (25 µg/mL) crude venom, or recombinant phospholipase-D (LiRecDT1) exposure, for 8 hours at 37°C, and immunostained with antibodies against recombinant phospholipase-D. For negative control, cells were processed identically, but in absence of toxin treatments. (I) Cells observed by Differential Interference Contrast (DIC), (II) Cells analyzed through Immunofluorescence. Scale bars were shown in the left of figure. (B) Human erythrocytes were exposed under identical conditions as described above to a recombinant fusion toxin GFP-LiRecDT1, or purified GFP alone, or

erythrocytes in the absence of treatments (as negative control), and analyzed by cell cytometry. Results point to specific binding of fusion protein on erythrocytes. (C) Human erythrocytes were treated with a recombinant fusion toxin GFP-LiRecDT1, using as negative control cells not exposed to venom toxins. Cells were observed by confocal microscopy. (I) Cells observed by DIC, (II) Cells analyzed through fluorescence. Scale bars were shown in the left of figure.

Figure 6. Brown spider recombinant phospholipase-D binding on the erythrocyte surface stimulates cytoplasmic membrane lipid reorganization. (A) Human erythrocytes suspended in Ringer solution were incubated for 4 hours with 25 μ g/mL of recombinant phospholipase-D. For negative control, cells were maintained only with Ringer Solution. Followed treatments, cells were incubated with annexin-V-FITC and analyzed through cell cytometry. Results point for binding of annexin-V and exposition of phosphatidylserine at the cell surface after whole venom and recombinant phospholipase-D treatments. (B) Human erythrocytes suspended in Ringer Solution were exposed to 25 μ g/mL of crude venom or recombinant phospholipase-D for 8 hours. Control cells were maintained only in Ringer Solution. After toxin treatments, lipid rafts were visualized with Cholera toxin subunit B and anti- Cholera toxin subunit B-Alexa-Fluor 594. Cells were analyzed through confocal microscopy. Arrow-heads point for reorganization of lipid rafts distribution on the erythrocyte cell surface as observed by aggregates of membranes. On the bottom of figures were shown details of DIC analyses of cells. Scale bar was shown in the left of figure.

Figure 7. Brown spider venom phospholipase-D catalysis plays a role on blood cell lysis. (A) Recombinant phospholipase-D (25 μ g/mL) was incubated with 1mM EGTA, or 1mM EDTA, or 1mM 1,10-phenanthroline, or 1mM PMSF or alone for 30 minutes. Additionally, washed erythrocytes from human suspended in TBS (Sucrose 250 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7.4), were exposed to recombinant phospholipase-D and inhibitors, for 24 hours, at 37°C and evaluated for hemolysis. Controls for hemolysis were performed using washed erythrocytes without toxin. Results represent averages of five experiments \pm S.E.M. $p \leq 0,05$, comparing erythrocytes treated by toxin in the presence or absence of inhibitors. (B) Human erythrocytes suspended in TBS (Sucrose 250 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7.4) were incubated with different concentrations of wild-type recombinant venom phospholipase-D (LiRecDT1), or site direct mutated recombinant phospholipase-D H12A (LiRecDT1 H12A), or in the absence of venom toxins (control), for 24 hours, at 37°C. Absorbances of supernatants were read at 550nm and percentage of hemolysis was determined using as 100% of hemolysis the absorbance values induced by distilled water (positive control). Results represent averages of five experiments \pm S.E.M. $p \leq 0,05$. (C) Human erythrocytes suspended in Ringer Solution (125mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 32mM Hepes, 5mM glucose, 1mM CaCl₂, pH 7.4) were incubated with 25 μ g/mL of *L. intermedia* crude venom, or site direct mutated recombinant phospholipase-D H12A (LiRecDT1 H12A), or in the absence of toxins (control) for different times (0, 4, 8, 16, 24hours), and then observed in an inverted microscope (Arrow-heads depict for spherocytes-like cells, and arrows point for stomatocytes-like cells), or 8 hours followed toxins exposure and observed through scanning electron microscopy (D). As observed, followed site direct mutated recombinant phospholipase-D H12A (LiRecDT1 H12A) treatment there were no morphological changes of erythrocytes even at the higher time assayed. Whereas whole venom

exposure induced changes which included the appearance of spherical and rounded cells (arrow shows knizocytes, asterisks depict stomatocytes, and arrow-heads point for spherocytes), compared to control cells that are biconcave disks flattened and depressed in the center. Scale bars were shown in the left of figure. (E) Confocal immunofluorescence microscopy analysis of human erythrocytes followed (25µg/mL) whole venom, or site direct mutated recombinant phospholipase-D H12A (LiRecDT1 H12A) exposure, for 8 hours at 37°C, and immunostained with antibodies against recombinant phospholipase-D. For negative control, cells were processed identically, but in absence of toxin treatments. (I) Cells observed by DIC, (II) Cells analyzed through Immunofluorescence. Scale bars were shown in the left of figure.

References

- Anliker, B., Chun, J., 2004. Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 20555-2055
- Appel, M. H; Da Silveira, R. B; Chaim, O. M; Silva, D. T; Chaves-Moreira, D; Da Silva, P. H; Paludo, K. S; Mangili, O. C; Senff-Ribeiro, A; Gremski, Nader, W; H. B; Veiga, S. S, 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Biochim. Biophys. Acta.* 1780, 167-178.
- Barbaro, K.C.; Cardoso, J.L.C.; Eickstedt, V.R.D.; Mota, I. 1992. Dermonecrotic and lethal components of *L. gaucho* spider venom. *Toxicon.* 30:331-338.
- Barbaro, K.C., Sousa, M.V., Morhy, L., Eickstedt, V.R., Mota, I., 1996. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Protein Chem.* 15, 337-343.
- Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon.* 45, 489-499.
- Bey, T.A., Walter, F.G., Lober, W., Schmidt, J., Spark, R., Schlievert, P.M., 1997. *Loxosceles arizonica* bite associated with shock. *Ann. Emerg. Med.* 30, 701-703.
- Binford, G.J., Cordes, M.H.J., Wells, M.A., 2005. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* 45, 547-60.
- Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez- Olórtegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. App. Pharmacol.* 211, 64-77.

Chung, S.M.; Bae, O.N.; Lim, K.M.; Noh, J.Y.; Lee, M.Y.; Jung, Y.S.; Chung, J.H., 2007. Lysophosphatidic Acid Induces Thrombogenic Activity Through Phosphatidylserine Exposure and Procoagulant Microvesicle Generation in Human Erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27. 414-421.

Cunha, R.B., Barbaro, K.C., Muramatsu, D., Portaro, F.C.V., Fontes, W., Sousa, M.V., 2003. Purification and characterization of Loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J. Protein Chem.* 22, 135-146.

da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spider and loxoscelism. *Toxicon* 44, 693-709.

da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie* 88, 1241-1253.

da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., Veiga, S. S., 2007a. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetylhexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, 49, 758-768.

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., 2007b. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89, 289-300.

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., 2007c. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* 406.

de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Araújo, S.C., Gabriel, M.Y., Mangili, O.C., Cruz, I., Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44, 273-280.

Eyster, K.M.; 2007. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advan Physiol Educ.* 31:5-16.

Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C.Q.B., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36, 1039-1051.

Forrester, L.J.; Barrett, J.T.; Campbell, B.J., 1978. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D. *Arch Biochem Biophys.* 187:355-65.

França, F.O.S., Barbaro, K.C., Abdulkader, C.R.M., 2002. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 96, 287-290.

Futrell, J., 1992. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* 304, 261-267.

Gomez, H.F., Miller, M.J., Waggener, M.W., Lankford, H.A., Warren, J.S., 2001. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. *Toxicon* 39, 817-824.

Harris, F.; Phoenix, D.A., 1997. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. *Biochimie.* 79. 17 1-174.

Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K., 2004. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* 44, 608-624.

Ingraham, L.M.; Burns, P.; Boxer, L.A.; Baehner, R.L.; Haak, R.A., 1981. Fluidity properties and lipid composition of erythrocyte membranes in chediak-Higashi Syndrome. *J. Cell Biology.* Vol. 89. 510-516,

Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Dornelas, H.G., de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Laborne, F.V., de Moura, J.F., Veiga, S.S., Chávez-Olórtegui, C., Granier, C., Barbaro, K.C., 2007. The LoxTox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon*, 51,

Kalfa, T.A.; Pushkaran, S.; Mohandas, N.; Hartwig, J. H.; Fowler, V.M.; Johnson, J. F.; Joiner, C. H.; Williams D. A.; Zheng, Y., 2006. Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood.* 108: 3637-3645.

Kurpiewski, G.; Forrester, L.J.; Barrett, J.T.; Campbell, B. J., 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 678: 467-476.

Kusma, J.; Chaim, O.M.; Wille, A.C.M.; Ferrer, V.; Sade, Y.B.; Donatti, L.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S., 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie. In press*

Lang, K. S.; Lang, P.A.; Bauer, C.; Durantón, C.; Wieder, T.; Huber, S.M.; Lang, F., 2005. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death. *Cell Physiol Biochem.* 15:195-202.

Lang, F.; Huber, S.M.; Szabo, I.; Gulbins, E., 2007. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462. 189–194.

Lee, S., K.R. Lynch., 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391, 317-323.

Luciano, M. N., Silva, P.H., Chaim, O.M., Santos, V.P., Franco, C.R.C., Soares, M.F.S., Zanata, S.M., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 455-467.

Lung, J.M., Mallory, S.B., 2000. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. *Int .J. Derm.* 39, 287-289.

Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa M.V., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* 5, 2167-2176.

Mitsutake, S.; Igarashi, Y., 2007. Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 359, 622-627.

Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. and Giepmans, B. N., 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26, 870-881.

Mota, I., Barbaro, K.C., 1995. Biological and biochemical-properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *J. Toxicol., Toxin Rev.* 14, 401– 421.

Murakami, M.T.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; Andrade,S.A.; Gabdoulkhakov, A.; Betzel, C.; Tambourgi, D.V.; Arni, R.K., 2006. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 342, 323–329.

Murray, L.M.; Seger, D.L., 1994. Hemolytic anemia following a presumptive brown recluse spider bite. *Clinical Toxicology.* 32(4). 451-456.

Ochi, S.; Oda, M.; Nagahama, M.; Sakurai, J., 2003. *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake. *Biochimica et Biophysica Acta* 1613; 79– 86.

Ochi, S.; Oda, M.; Matsuda, H.; Ikari, H.; Sakurai, J., 2004. *Clostridium perfringens* - Toxin Activates the Sphingomyelin Metabolism System in Sheep Erythrocytes. *The journal of biological chemistry.* 279. 26: 12181–12189.

Oda, M. T.; Matsuno, R.; Shiihara, S.; Ochi, R.; Yamauchi, Y.; Saito, H.; Imagawa, M.; Nagahama, M.; Nishizawa, M.; J. Sakurai., 2008. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* α -toxin. *J. Lipid Res.* 49: 1039–1047.

Ohanian, J.; Ohanian. V., 2001. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *CMLS, Cell Mol. Life Sci.* 582: 053-2068.

Ribeiro, R.O.S.; Chaim, O. M.; Da Silveira, R.B.; Gremski, L. H.; Sade, Y. B.; Paludo, K. S.; Senff-Ribeiro, A.; De Moura, J.; Chávez-Olórtegui, C.; Gremski, W.; Nader, H. B.; Veiga, S.S., 2007. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 50. 1162–1174,

Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Paniagua-Solis, J., Alagón, A., Stock, R.P., 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusae*. *Toxicon* 44, 507-514.

Sakurai, J.; M. Nagahama.; M. Oda. 2004. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J.Biochem. (Tokyo)*. 136: 569–574.

Souza, A.L.; Malaque, C.M.; Sztajnbock, J.; Romano, C.C.; Duarte, A.J.; Seguro, A.C., 2008. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon*. 51. 151–156.

Swanson, D.L., Vetter, R.S., 2006. *Loxoscelism*, *Clin. Dermatol.* 24, 213-221.

Udden, M.M., 2005. Effects of diethylene glycol butyl ether and butoxyethoxyacetic acid on rat and human erythrocytes. *Toxicology Letters*. 156. 95-101.

Williams, S.T., Khare, V.K., Johnston, G.A., Blackall, D.P., 1995. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. *Am. J. Clin. Pathol.* 104, 463-467.

Wood, B.L.; Gibson, D.F.; Tait, J.F., 1996. Increased Erythrocyte Phosphatidylserine Exposure in Sick Cell Disease: Flow-Cytometric Measurement and Clinical Associations. *Blood*. 88: 1873-1880.