

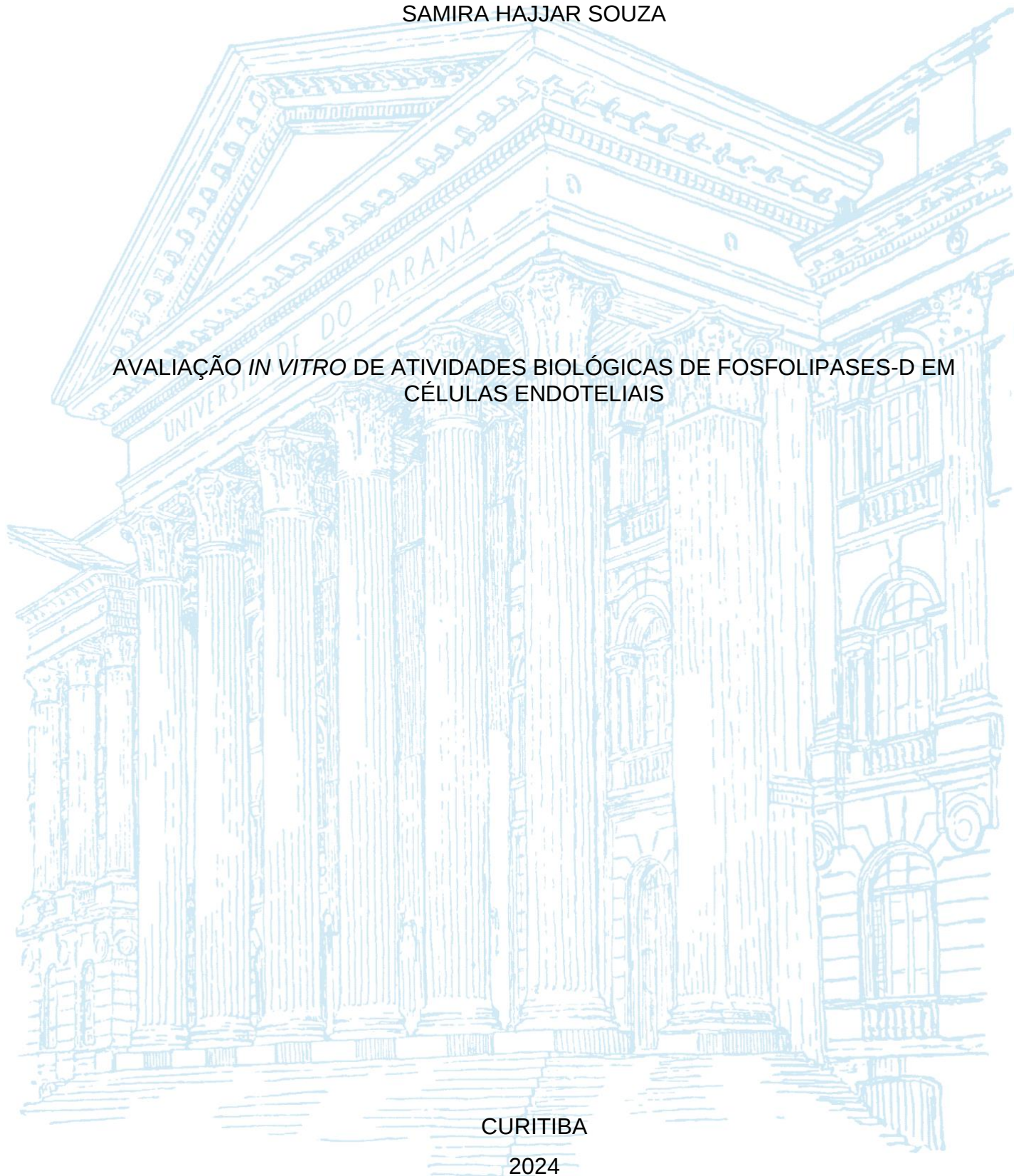
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SAMIRA HAJJAR SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOSFOLIPASES-D EM
CÉLULAS ENDOTELIAIS

CURITIBA

2024



Samira Hajjar Souza

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOSFOLIPASES-D EM
CÉLULAS ENDOTELIAIS

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Coorientadora: Msc. Dra. Hanna Camara da Justa

CURITIBA

2024

TERMO DE APROVAÇÃO

SAMIRA HAJJAR SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOSFOLIPASES-D EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Orientador – Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.

Prof(a). Dr(a) Marianna Bóia Ferreira

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 2 de dezembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

De início, quero agradecer a Deus e a todos que me ouviram quando eu pedia baixinho, antes de dormir, proteção e ajuda nos momentos difíceis. Por terem sempre me guiado e me dado discernimento para fazer as escolhas que fiz até hoje.

Agradeço à minha mãe que sempre fez o possível e o impossível por mim, por sempre se preocupar com cada minuto do meu dia e cada parte de mim. Por me apoiar em toda e qualquer ocasião, independente de tudo. Minha trajetória até aqui não teria acontecido se não fosse por ela.

Ao meu pai, que mesmo a exatos 1183 km de distância, sempre esteve por perto. Eu o agradeço por ter me ensinado a ter fé e a acreditar em mim. Por ter me feito manter a calma nos contratempos da vida e por toda noite pedir a Deus que me cuidasse. Só meu coração sabe, o quanto eu o admiro e a forma que trago comigo a bondade e honestidade que ele me ensinou a ter.

À minha família que sempre me zelou e nunca hesitou em me acolher nos abraços mais apertados e carinhos de unha bem-feitos. Levo comigo a maior das saudades, todos os dias.

Aos meus amigos da vida, de União, da faculdade, do laboratório e do coração, que sempre foram sinônimo de lar, sem eles eu não teria conseguido. Agradeço em especial à Maisa, que desde 2014 me acompanha e apoia, além de ter me ajudado a crescer como pessoa.

Só tenho admiração e carinho, por cada um que passou, que ficou ou que já foi embora. Dedico esse trabalho a todos vocês.

RESUMO

O gênero de aranhas *Loxosceles* é cosmopolita, sendo encontrado em todos os continentes e inclui espécies que representam riscos à saúde no Brasil, como *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Essas aranhas são peçonhentas e a inoculação de seu veneno é responsável por desencadear o quadro clínico denominado loxoscelismo. Essa condição pode se apresentar em quadros clínicos que incluem manifestações cutâneas como dermonecrose e sintomas sistêmicos como falência renal e distúrbios hematológicos, tais como hemólise intravascular e anemia hemolítica, podendo ser fatal. Esses efeitos são causados por toxinas presentes no veneno, como as fosfolipases-D (PLD). Uma isoforma de PLD do veneno de *L. intermedia* é o foco deste estudo, pois sozinha produz a maioria dos sintomas do envenenamento. Embora existam estudos sobre PLDs, ainda há lacunas no entendimento de sua ação. Neste projeto, uma isoforma recombinante de PLD do veneno de *L. intermedia* foi testada em células endoteliais humanas (EA.hy926), de forma a considerar o endotélio da derme um dos primeiros e principais tecidos a entrar em contato com as toxinas. Para isso, foram realizados processos de expressão e purificação da PLD recombinante, cultivo celular, ensaio de morfologia, imunofluorescência, ensaios de viabilidade (MTT e Vermelho Neutro) e de proliferação celular. A morfologia das células não se mostrou afetada após a exposição com a toxina, de forma que os tratamentos ao longo do tempo, até 24 horas, eram comparativamente iguais aos controles negativos. A imunofluorescência com células EA.hy926 mostrou que a PLD se liga à membrana celular já após cinco minutos de exposição, mostrando um perfil de ligação não contínuo e pontual na membrana plasmática e hipoteticamente sendo eliminada da superfície das células por meio de microvesículas extracelulares. Os ensaios de viabilidade MTT e Vermelho Neutro não indicaram alteração da viabilidade celular, após comparar com o controle negativo. Além disso, o ensaio de proliferação também não mostrou diferença ao comparar os resultados da ação da toxina sobre as células com o controle negativo do experimento, indicando que a PLD não altera o perfil proliferativo das células. Novos ensaios de interesse serão realizados no futuro, como o de imunofluorescência com dupla marcação para membrana e PLD, e isolamento de microvesículas para análises dos conteúdos transportados, sendo hipoteticamente a PLD, miRNA e/ou conteúdo lipídico. Além disso, também é de interesse a realização do estudo da expressão gênica e microscopia eletrônica de varredura para a melhor compreensão da mecanística das PLDs sobre a biologia celular de células endoteliais.

Palavras-chave: Loxoscelismo; Aranha-marrom; Fosfolipase-D; Ectossomos; Resposta Inflamatória.

ABSTRACT

The *Loxosceles* spider genus is cosmopolitan, found worldwide, and includes species that represent health risks in Brazil, such as *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho*. These spiders are venomous, and can cause loxoscelism, a condition with clinical manifestations ranging from skin necrosis to systemic effects, like kidney failure and blood disorders, such as hemolytic anemia and intravascular hemolysis which can be fatal. These effects are mainly linked to toxins in the venom, such as phospholipase-D (PLD). This study focuses on one recombinant PLD isoform from *L. intermedia* venom, as it alone triggers most symptoms of envenoming. Despite existing researches, the mechanisms underlying PLD action upon cells remain poorly understood. This work tested the PLD effect on human endothelial cells (EA.hy926), considering the endothelium as one of the first tissues to interact with the toxin into the dermis. The study included PLD expression and purification, cell culture, morphological analysis, immunofluorescence, viability assays (MTT and Neutral Red), and cell proliferation assay. Results pointed that the cell morphology was not affected after exposure to the toxin, as the treatments over time, up to 24 hours, were comparable to the negative controls. Immunofluorescence revealed that PLD binds to the cell membrane just within five minutes after exposure, forms localized structures like extracellular microvesicles on cell surface and is hypothetically expelled from cells as supramolecular structures. Viability assays (MTT and Neutral Red) revealed no significant changes compared to the negative control. Likewise, the proliferation assay showed no differences on the proliferative profile after PLD exposure compared to control. Future research will include immunofluorescence with different markers, isolation of microvesicles to analyze their contents (potentially PLD, miRNA, and/or lipids), gene expression studies, and scanning electron microscopy to better understand the cytotoxicity mechanisms of PLD.

Keywords: Loxoscelism; Brown spider; Phospholipase-D; Ectosomes; Inflammatory Response.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO 1: ARTIGO PUBLICADO COM CO-AUTORIA.....	36

1 INTRODUÇÃO

O Loxoscelismo refere-se aos sinais e sintomas clínicos decorrentes da picada de aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas como aranhas-marrom. No Brasil, especialmente na região Sul, três espécies possuem importância médica, sendo elas *Loxosceles laeta*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles gaucho* (Da Silva *et al.*, 2004; Marques-Da-Silva e Fischer., 2005; Gremski *et al.*, 2014, 2020). Embora não sejam agressivas, essas aranhas injetam veneno ao se sentirem ameaçadas, ao serem pressionadas contra superfícies, ao se vestir ou ao se caçar. Em humanos, a picada pode causar o loxoscelismo, manifestado em quadros cutâneos e/ou sistêmicos, incluindo dermonecrose, e falência insuficiência renal aguda, hemólise intravascular e anemia hemolítica. No Brasil, a notificação desses casos é obrigatória, mas muitos acidentes não são registrados devido ao desconhecimento da espécie e diagnósticos imprecisos (SINAM).

O veneno dessas aranhas contém peptídeos inseticidas, metaloproteases, hialuronidases, serinoproteases, serpinas e fosfolipases-D (PLDs) (Gremski *et al.*, 2014). As PLDs representam aproximadamente 65,4% dos transcritos do veneno de *L. intermedia* e são responsáveis pela maioria dos sintomas do loxoscelismo (Gremski *et al.*, 2014, 2020; Theodoro, 2024), tornando seu estudo essencial. Para investigar a PLD, foi utilizada uma forma recombinante de *L. intermedia* (LiRecDT1), expressa em modelos procariotos. Muitos dos efeitos causados pelas PLDs são devido a sua atividade catalítica, utilizando como substrato fosfolipídios de membrana, clivando-os e liberando mediadores inflamatórios, de forma a desencadear uma ativação de leucócitos e inflamação exacerbada (Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022).

O tecido endotelial reveste internamente vasos sanguíneos e linfáticos e é um dos primeiros tecidos a entrar em contato com as toxinas decorrentes de um envenenamento por aranhas *Loxosceles*, uma vez que a inoculação do veneno ocorre na derme, tecido onde os vasos sanguíneos estão presentes. O tecido endotelial é sensível ao contato com agentes externos como toxinas. Alguns estudos já foram realizados buscando entender a ação do veneno e das fosfolipases-D em células endoteliais em cultura. Em células da linhagem RAEC (células endoteliais de aorta de coelho), foi mostrado na literatura que o veneno total de *L. intermedia* causa uma série de mudanças notáveis, incluindo alterações na morfologia celular, perda de aderência entre células e à matriz extracelular circundante, diminuição da taxa de crescimento e

morte celular dentro de um período de aproximadamente 48 horas após exposição ao veneno (Veiga *et al.*, 2001; Paludo *et al.*, 2006; Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022). Ademais, já foi descrito que o veneno total (também de *L. intermedia*) interage com a superfície celular e é internalizado por essas células sendo direcionado para vesículas ácidas (Nowatzki *et al.*, 2010). Em outro estudo, Gomez, H. *et al* (1999) mostrou que células da linhagem HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) incubadas com o veneno total de *Loxosceles deserta* por 8 horas, passaram a produzir quimiocinas IL-8, MCP-1 e GRO- α , moléculas importantes no processo inflamatório.

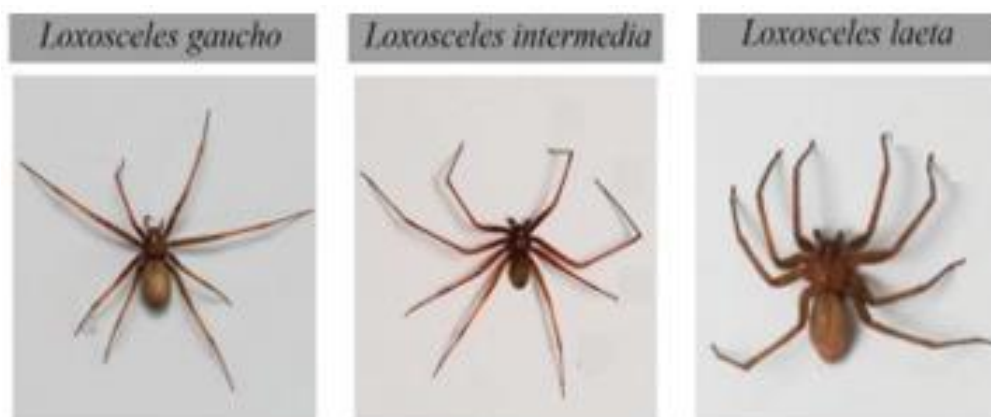
Nesse contexto, células EA.hy926 (linhagem endotelial híbrida de células somáticas e veia umbilical humana), foram utilizadas neste projeto como ferramenta para aprofundar essas informações. Estudar como essas células respondem às PLDs purificadas é fundamental para entender a complexidade e a ação dessas toxinas, contribuindo assim para um melhor entendimento de seus efeitos no contexto da picada destas aranhas e a respeito de novos mecanismos dentro da biologia celular. Para isso, como objetivos específicos, estabeleceu-se a produção da LiRecDT1 em cepa bacteriana de expressão, purificação e avaliação da atividade catalítica da mesma; verificação do perfil de ligação da toxina na membrana plasmática e matriz extracelular de células; e avaliação da ação da toxina sobre alguns processos celulares, por meio de ensaios de viabilidade e proliferação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LOXOSCELES

As aranhas-marrom, do gênero *Loxosceles* (família Sicariidae, sub-ordem Labidognatha), possuem coloração amarronzada predominante, corpo com pelos e dimorfismo sexual: as fêmeas são maiores com pernas de menor comprimento, enquanto os machos são menores em relação ao corpo e com pernas mais longas, variando de 8 a 15 mm no corpo e 8 a 30 mm nas pernas (Da Silva *et al.*, 2004; Theodoro *et al.*, 2024). Essas aranhas são noturnas, habitam locais preferencialmente escuros e secos, e, embora não sejam agressivas, picam de forma a se defender quando se sentem ameaçadas. Alimentam-se de pequenos insetos, resistem a variações extremas de temperatura e podem sobreviver sem alimento e água por um tempo significativo (Futrell, 1992; Silva *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022). *Loxosceles* é um gênero cosmopolita com registros de acidentes por todos os continentes no planeta. No Brasil, especialmente nas regiões Sul e Sudeste, as espécies *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia* (FIGURA 1) são uma preocupação de saúde pública (Da Silva *et al.*, 2004; Marques-Da-Silva e Fischer, 2005; Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022). Essas espécies são comumente encontradas em residências, devido ao desmatamento e à destruição de seu habitat natural. A picada dessas aranhas provoca o quadro de loxoscelismo, resultado da inoculação de veneno produzido em glândulas na região anterior do corpo do animal e injetado pelas quelíceras. O veneno tem ação proteolítica, hemolítica e fosfolipásica, podendo causar dermonecrose e problemas renais graves, além de anemia hemolítica (Futrell *et al.*, 1992; Da Silva *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022).

FIGURA 1 – IMAGENS DAS TRÊS ESPÉCIES DE ARANHA-MARROM



FONTE: Adaptado de Theodoro, 2023

2.2 O VENENO

O veneno das aranhas-marrons (*Loxosceles*) é injetado em quantidades mínimas, sendo apenas alguns microlitros. Esse veneno possui um aspecto cristalino e é secretado por um par de glândulas especializadas, localizadas na parte anterior do corpo do animal (Da Silva *et al.*, 2004., Chaves-Moreira *et al.*, 2009), mais especificamente no prossoma (cefalotórax) para auxiliar na predação. A composição do veneno possui moléculas e enzimas de alta e baixa massa molecular como hialuronidases, fosfatases, peptidases, collagenases, serpinas, metaloproteases e fosfolipases-D (Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022).

Em Theodoro, 2023, foi sequenciado o transcriptoma da glândula de veneno da espécie *L. intermedia*, de forma que foi possível identificar as proporções dos transcritos dessas toxinas. Com esse estudo, observou-se que de fato algumas toxinas são mais abundantes e expressas do que outras. Por exemplo, as fosfolipases-D que compõem mais de 60% dos transcritos das toxinas encontradas no veneno, sendo as enzimas mais investigadas por conta de seu potencial e papel no envenenamento. Ademais, as metaloproteases são encontradas em grande quantidade, em relação ao veneno total dessa espécie, totalizando 19,2% dos transcritos; essas são enzimas atuantes no impedimento da regeneração do tecido ocasionado, aumentando a permeabilidade e espalhamento do veneno com maior velocidade. Outros compostos como os peptídeos inseticidas resultam em mais de 13% dos transcritos no total (Theodoro., 2024; Ferrer *et al.*, 2013). Alguns transcritos, como as enzimas hialuronidases e as serinoproteases, encontram-se menos abundantes, porém seus papéis continuam sendo muito importantes para a atividade do veneno. As hialuronidases atuam degradando ácido hialurônico presente na matriz

extracelular (MEC) e contribuem como agentes espalhadores, no processo de disseminação do veneno no tecido. Dados publicados na literatura nos artigos de Ferrer et al (2013) e De-Bona et al (2021), indicaram atividade hemorrágica e inflamatória aumentada nos tecidos dos animais inoculados com essa enzima, quando utilizada em conjunto com a PLD purificada, ou seja, potencializando assim a ação dermonecrótica da PLD. Já as serinoproteases possuem atividade desconhecida até o momento, mas há hipóteses especulativas quanto à sua funcionalidade, sugerindo ação participativa na digestão extracorpórea que ocorre após a presa ser picada e consequentemente, envenenada (Gremski et al., 2021). Entre os grupos de menor porcentagem, estão também incluídas as serpinas que são inibidores de serinoproteases e outras enzimas, que atuam em processos fisiológicos da aranha, mas ao mesmo tempo causam necrose e hemorragia em tecidos (Schemczssen et al., 2021). A proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP) atua no quadro inflamatório após inoculação da peçonha, além de interferir no sistema imune e proliferação celular, como foi observado em células MCF-7 e HT-29 trabalhadas no estudo de Ferreira-Boia (Ferreira-Boia et al., 2018). A TCTP também faz parte do grupo de toxinas menos expressas, assim como a toxina alergênica presente no veneno de *L. intermedia*, denominada LALLT, que induz atividade alergênica, como degranulação de mastócitos e edema (Da Justa et al., 2020).

2.3 LOXOSCELISMO

O loxoscelismo é o conjunto de sintomas cutâneos e/ou sistêmicos, gerados a partir da picada da aranha-marrom. As formas como esses sintomas se manifestam dependem e variam conforme a espécie, sexo e quantidade de veneno inoculado pela aranha. Ademais, o local da picada e o estado de saúde da pessoa acidentada também são fatores que influenciam a gravidade do caso (Barreto et al., 1985; Tambourgi et al., 1995, 1998; Barbaro et al., 1996; de Oliveira et al., 1999; de Oliveira et al., 2005; Pretel et al., 2005). Os sintomas do quadro sistêmico, embora mais raros, incluem insuficiência renal aguda, hemólise intravascular e anemia hemolítica, podendo ser fatais (Futrell, 1992; Da Silva et al., 2004). Já os sintomas do quadro cutâneo, mais comuns, começam com dor e vermelhidão no local da picada ou nas proximidades, evoluindo para edema, redução do fluxo sanguíneo, hemorragia e lesões de necrose (FIGURA 2). A área afetada adquire uma aparência marmórea com um halo avermelhado, arroxeadado e amarelado. A ferida pode evoluir para a destruição

total do tecido e úlceras crônicas ao longo de semanas (Da Silva *et al.*, 2004; Isbister e Fan, 2011; Gremski *et al.*, 2014). A resposta ao veneno varia entre diferentes animais expostos. Camundongos por exemplo, não desenvolvem feridas dermonecróticas, enquanto humanos e coelhos, sim. Embora a causa exata destas diferenças ainda seja desconhecida, a composição molecular e celular da derme dos coelhos é mais semelhante à humana, resultando em feridas similares. Uma hipótese para a ausência de dermonecrose em camundongos seria a diferença na composição lipídica de suas membranas celulares (Silva *et al.*, 2004).

FIGURA 2 – FERIDA DERMONECRÓTICA VISTA NO LOXOSCELISMO CUTÂNEO



FONTE: Adaptado de Maguiña Vargas *et al.*, 2017.

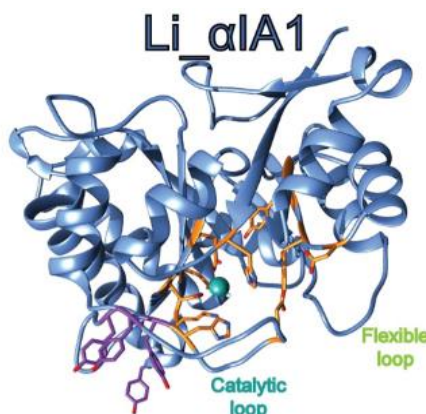
2.4 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular é um processo que permite crescer e monitorar diversas linhagens celulares em um ambiente controlado. Esse processo envolve etapas como descongelamento, manutenção, crescimento e congelamento das células. As linhagens celulares podem ser mantidas em diferentes meios de cultura: DMEM é usado para HeLa (tumoral), EA.hy926 (endotelial) e outras; F12 para RAEC (endotelial); e RPMI 1640 para THP-1 (monócitos) e linfócitos. Esses meios são geralmente combinados com soro fetal bovino, que fornece fatores de crescimento e

auxilia na divisão celular. O cultivo ocorre em placas de petri ou garrafas, em uma estufa com 5% de CO₂, a 37°C. Durante a passagem das células e troca de garrafas, diferentes enzimas como Tripsina e o complexo da Viocase, ou EDTA são usadas para desadesão celular, dependendo da linhagem. Para o congelamento, suspensões celulares na presença de um crioprotetor, como DMSO, são mantidas à -194 C° em Nitrogênio líquido.

2.5 FOSFOLIPASE-D E SUA AÇÃO EM DIFERENTES TIPOS CELULARES

As fosfolipases-D (PLDs) são as toxinas mais estudadas do veneno, visto que a atuação desse grupo de moléculas é capaz de promover grande parte dos sintomas do loxoscelismo por si só, como a dermonecrose, injúrias renais e sistêmicas. As PLDs de *Loxosceles* têm massa molecular em torno de 35 kDa. A estrutura tridimensional tem formato de um barril expandido, composta de 8 α -hélices e 8 folhas- β e loops auxiliares (FIGURA 3), contando ainda com um sítio ligante de Mg²⁺ importante na interação com os substratos, de maneira a reconhecer, realizar e manter a ligação do complexo enzima-substrato (Murakami *et al.*, 2006). De forma mais simples, a fosfolipase-D age clivando fosfolipídeos de membrana; essa reação atua nas ligações fosfodiéster ao degradar esfingomielina liberando mediadores lipídicos bioativos como colina e ceramida 1-fosfato (C1P), ou formação de ácido lisofosfatídico (LPA) e produtos cíclicos (Murakami *et al.*, 2005, Gremski *et al.*, 2020). A enzima PLD, portanto, acaba gerando consequências celulares como a degradação da membrana plasmática, perda de características essenciais da membrana como a assimetria e fluidez, além de perda de funcionalidade de *lipid rafts*; estes são processos que ocorrem em diversas células ao interagirem com a PLD e que estão relacionados à função e regulação em contextos fisiológicos e patológicos. Ademais, os lipídios mediadores de sinais inflamatórios liberados, ativam cascatas de sinalização com efeitos de agregação plaquetária, inflamação e infiltração de neutrófilos, aumento da vascularização e permeabilidade de vasos, edema, dermonecrose, hemólise, insuficiência renal, citotoxicidade *in vitro* e até mesmo efeitos de letalidade (Tambourgi *et al.*, 2002., Tambourgi *et al.*, 2010; Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022).

FIGURA 3 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PLD DE *L. INTERMEDIA*.

FONTE: Adaptado de Moutoussamy *et al.*, 2022.

Para melhor compreensão desses efeitos e da PLD, isoformas recombinantes já foram produzidas em laboratório. No total, atualmente, a literatura descreve a existência de 18 isoformas, 11 da espécie *L. intermedia*, 6 de *L. laeta* e 1 de *L. gauchoi* (Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022). Dentro do grupo das isoformas encontradas em *L. intermedia*, está a LiRecDT1, que é a mais expressa na glândula de veneno (Gremski *et al.*, 2010, 2014). Essa proteína tem atividade dermonecrótica e induz diretamente a nefrotoxicidade em camundongos e em culturas de células renais. Por outro lado, existem isoformas que não possuem determinadas atividades como por exemplo LiRecDT3 e LiRecDT5, que não causam dermonecrose, agregação plaquetária, nem aumento de permeabilidade vascular, sendo a LiRecDT3 incapaz de causar letalidade em camundongos (Gremski *et al.*, 2010; Gremski *et al.*, 2020). Ainda foram expressas PLDs com mutações aminoacídicas diversas, que inibiram suas atividades catalíticas, porém continuaram com sua estrutura tridimensional íntegra (Vuitika *et al.*, 2016, Gremski *et al.*, 2014, 2020, 2022).

Algumas isoformas foram testadas *in vitro* em algumas células, por exemplo um ensaio no qual a incubação de LiRecDT1 mostrou que essa toxina em células B16-F10 (células de melanoma murino) resulta em influxo de cálcio, proliferação celular e afeta a composição dos fosfolipídeos da membrana plasmática, sugerindo sítios de ligação de PLD presentes na superfície celular (Wille., *et al.* 2013). Outro estudo realizado também com a LiRecDT1, mostrou que ela induziu a degradação de fosfolipídios de membrana, principalmente daqueles que possuíam ácido fosfatídico,

gerando mediadores lipídicos diversos (McDermott., *et al* 2004; Gomez-Cambroner., *et al* 2010; Roth., *et al* 2008).

Alguns estudos *in vitro* também foram feitos com o veneno total. O estudo de Gomez, H. *et al* (1999) mostrou que em HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) ao serem incubadas com o veneno total de *Loxosceles deserta* por 8 horas, resultou na produção de quimiocinas IL-8 , MCP-1 e GRO-a , moléculas importantes no processo inflamatório. Esses dados indicaram que o veneno de aranhas *Loxosceles* é um forte indutor de quimiocinas α e β em células endoteliais, sendo relevantes para a compreensão da fisiopatologia dos sintomas induzidos pela picada loxoscélica.

O endotélio é um tecido de revestimento e de contato primário com a toxina, no qual as reações começam a acontecer desencadeando os processos inflamatórios. Ele apresenta funcionalidade ampla como angiogênese, papel recrutador de células do sistema imunológico atuantes na inflamação, regulador de pressão arterial, entre outros, sendo assim essencial seu estudo para o entendimento da reação inflamatória exacerbada do Loxoscelismo. As células desse tecido são objeto de estudo deste projeto, mais especificamente da linhagem EA.hy926.

Tem-se como já observado e descrito na literatura, a ação do veneno de *L. intermedia* em células endoteliais RAEC, resultando em perda de adesão ao substrato e célula-célula, degradação de matriz celular (liberando proteoglicanos da matriz e da superfície celular que extravasam para o meio de cultura) (Veiga *et al.*, 2001; Paludo *et al.*, 2006). Ademais, reconhece-se que o veneno tem ação na superfície celular, mas que também é internalizado na célula e direcionado para vesículas ácidas (Nowatzki *et al.*, 2010) e que as toxinas agem tanto no endotélio, quanto na membrana basal subendotelial que auxilia na integridade dos vasos (Zanetti *et al.*, 2002). Dessa forma, o estudo das PLDs de forma isolada, em células endoteliais humanas (EA.hy926), é um modelo promissor para investigar respostas celulares frente a LiRecDT1 e entender a complexidade e a ação dessas toxinas, contribuindo assim para um melhor entendimento de seus efeitos no contexto do loxoscelismo e a respeito de novos mecanismos celulares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E DOSAGEM DA LiRECDT1

A LiRecDT1 foi expressa a partir de um modelo procarioto em bactérias da cepa BL21(DE3)PLysS. Para o pré inóculo, utilizou-se uma colônia bacteriana contendo a construção plasmidial com a LiRecDT1. O meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) foi usado para o crescimento da colônia. O pré-inóculo deu início ao crescimento das bactérias que posteriormente foi diluído em 1:100 para fazer o inóculo, sendo monitorado por um espectrofotômetro, baseando-se na densidade óptica. Após aproximadamente 3 horas em agitação constante, adicionou-se IPTG (0,05 mM) à cultura e a mesma foi mantida a 30 ° C por 3,5 horas. Após o término da expressão, resfriou-se a cultura e após esse processo, foi centrifugada a 4000 xg. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; e imidazol 10 mM) com 1 mg/mL de lisozima. A amostra após ser ressuspensa e homogeneizada, foi sonicada visando a lise mecânica das bactérias, com objetivo de obtenção da proteína produzida.

Para a purificação da PLD, a amostra já sonicada e centrifugada (mantendo apenas o sobrenadante) foi filtrada em filtro 0,22 µm, sendo então submetida a um método de cromatografia de afinidade níquel-agarose. Essa etapa foi realizada por meio de uma coluna acoplada ao equipamento ÄKTA pure™, onde é realizada a ligação da etiqueta de histidina presente na proteína recombinante ao níquel presente na coluna. Após a aplicação da amostra, a coluna passou por uma lavagem com tampão A (NaH₂PO₄ 20mM, NaCl 500mM) e por uma eluição gradual realizada com o tampão B contendo imidazol (NaH₂PO₄ 20mM, NaCl 500mM, Imidazol 500mM). As frações resultantes da eluição foram submetidas a três diálises com PBS (NaCl 100 mM; Tampão Fosfato de Sódio 10 mM; pH 7,3), centrifugadas e dosadas para concentração de proteína pelo método de Bradford.

3.2 AVALIAÇÃO DE PUREZA DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE

Para a avaliação de pureza, amostras de diferentes tempos ao longo do processo de expressão foram submetidas a uma eletroforese. Amostras pré e pós adição de IPTG, amostra após a purificação e um marcador de massa molecular (T0, T1h, T3,5h, amostra purificada e M) foram fervidos, juntamente com um tampão redutor de amostra com 5% de Mercaptoetanol e submetidas a uma corrida em gel de poliacrilamida 12,5%, com corrente elétrica de 25 Amperes, submerso em um tampão de corrida. Posteriormente, esse gel foi corado com Azul de Coomassie e descorado com metanol 30%.

3.3 AMPLEX RED

Para garantir que a atividade catalítica da PLD estava íntegra, foi feito o ensaio de Amplex RED que possui o substrato da enzima, a esfingomielinase. Utilizou-se 0.5 µg e 3 µg da PLD expressa e purificada. De uma forma geral, o ensaio consiste na oxidação da colina, que produzirá H₂O₂, que por sua vez, na presença da peroxidase, reagirá com o Amplex RED gerando o produto fluorescente Resorufin. Este foi lido no equipamento TECAN (Espectrofluorímetro) no comprimento de onda de 540 nm e 570 nm. O gráfico para as análises foi gerado pelo programa GraphPad Prism 8.0.2, utilizando análise ANOVA (*one-way*), com a significância definida como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$.

3.4 CULTIVO CELULAR

As células EA.hy926, armazenadas em nitrogênio, passaram por um descongelamento em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e foram armazenadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. Para subcultivo, foram soltas utilizando a enzima Tripsina e colocadas em novas garrafas estéreis. A contagem celular tanto para os experimentos quanto para o congelamento foi feita em Câmara de Neubauer. Para o congelamento, 1×10^6 células foram congeladas, aproximadamente, com 10% de DMSO e 45% de SFB. Os *vials* foram mantidos em um congelador comum por duas horas e posteriormente levados para um *ultrafreezer* a -80°C, sendo depois transferidos para o armazenamento em nitrogênio.

3.5 ENSAIO DE MORFOLOGIA

Para verificar a morfologia das células EA.hy926 após a exposição à LiRecDT1, inicialmente, três quantidades de células foram plaqueadas para que, após 24 horas, fosse escolhida a melhor quantidade de acordo com a confluência das células nos poços. Quantidades de 30 mil, 40 mil e 50 mil células foram plaqueadas em placas de 24 poços e ao final foi escolhida a quantidade de 40 mil. Em seguida, realizou-se a incubação com a toxina (100 µg/mL), que equivale a 40 µg de PLD por poço de cultura, e para o controle negativo foi utilizado PBS, ambos com meio DMEM sem soro fetal bovino. O registro das imagens foi feito em diferentes tempos, sendo eles 0h, 2h, 4h, 6h, 8h e 24h de exposição, em um microscópio de luz invertida (Leica Microsystems) acoplado a um computador, utilizando o *software* LAS EZ.

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA CONFOCAL

Neste ensaio, aproximadamente duas mil e quinhentas células foram plaqueadas e expostas à PLD (LiRecDT1) em uma concentração de 100 µg/mL (já padronizado) por períodos diversos de tempo, sendo 5 minutos, 15 minutos e 30 minutos, contendo um controle negativo com PBS no lugar da toxina. Posteriormente, as lamínulas foram fixadas com 300 µl de paraformaldeído 2%, por 30 minutos e 350 µl de glicina 0,1M por 2 minutos. Esses processos seguiram sendo intercalados por lavagens com PBS 1x estéril. Em seguida, aplicou-se a Lectina-WGA 594, que se liga à membrana plasmática, marcando as células em vermelho, processo realizado na ausência de luz, por 10 minutos. Após, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS 1x estéril e foi realizado um bloqueio com PBS-BSA (250 µl) por 20 minutos, impedindo ligações inespecíficas. Em seguida, adicionou-se 250 µl de anticorpo primário que reconhece a PLD, produzido em camundongos, em cada uma das lamínulas, por 40 minutos em constante rotação. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1x estéril e então foi colocado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com ALEXA 488, corando a toxina de verde, e junto dele o DAPI, intercalante de DNA que cora o núcleo de azul, também em 250 µl, por 40 minutos em constante rotação. Depois, as lamínulas foram lavadas e com Fluoromount, fixadas nas suas respectivas lâminas. Por fim, as imagens foram visualizadas e registradas por imunofluorescência confocal no equipamento A1R MP+ Nikon.

3.7 ENSAIOS DE VIABILIDADE: MTT

Para o ensaio de viabilidade MTT em EA.hy926, foram realizados experimentos com 1×10^4 , 7×10^3 e 5×10^3 células (números padronizados). As células foram mantidas em placas de 96 poços, utilizando meio de cultura DMEM com 10% de SFB. Após 24 horas, adicionou-se meio DMEM sem SFB. Após 2 horas, o meio foi aspirado e foi realizada a incubação da LiRecDT1 na concentração de 100 µg/mL nas células. Como controle negativo, PBS foi utilizado juntamente com meio de cultura. Após 24 horas, os meios foram aspirados e o reagente MTT colocado na concentração de 0,5 µg/mL em todos os poços, na ausência de luz. Duas horas depois, adicionou-se 100 µL de DMSO que foi homogeneizado, e então a absorbância da placa lida em um leitor de placas, a 550 nm, no equipamento Meridian/Elx800. O gráfico foi gerado

pelo programa GraphPad Prism 8.0.2, e a análise utilizada foi a ANOVA (*two-way*) com significância definida como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$.

3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE: VERMELHO NEUTRO

Para o ensaio de viabilidade com o corante Vermelho Neutro, 10^4 , 7×10^3 e 5×10^3 células EA.hy926 (padronizado) foram plaqueadas em placas de 96 poços, utilizando meio de cultura DMEM com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio foi aspirado e adicionou-se meio DMEM, sem SFB. Duas horas depois, o meio foi aspirado e realizou-se a incubação da LiRecDT1 nas células. Como controle negativo, utilizou-se PBS com meio de cultura. Os experimentos foram feitos em quadruplicatas com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de toxina por poço. Após 24 horas, os meios foram aspirados, os poços lavados com PBS 1x estéril e 100 μL do corante Vermelho Neutro adicionado. Três horas depois, a solução foi aspirada e os poços lavados com PBS 1x novamente, seguido da adição de 150 μL de solução volátil composta por 50% de etanol, 49% de água Milli-Q e 1% de ácido acético. Após esse processo, realizou-se a homogeneização dos poços e a leitura de absorbância foi realizada em um leitor de placas a 550 nm no equipamento Meridian/Elx800. O gráfico foi gerado pelo programa GraphPad Prism 8.0.2, com a análise ANOVA (*two-way*) com significância definida como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$.

3.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO: CYQUANT

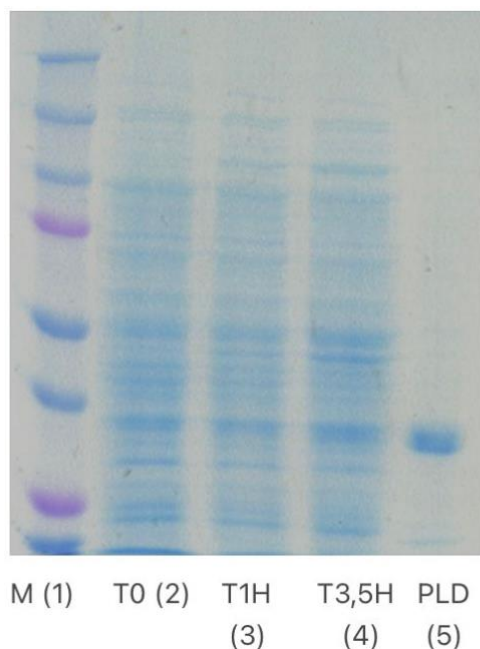
Nesse ensaio, 10^4 , 7×10^3 e 5×10^3 células foram plaqueadas (número padronizado) em quadruplicatas para serem submetidas ao ensaio. Incubou-se a PLD na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, além do controle com PBS. Após 24 horas, os meios foram aspirados e a placa levada ao *ultrafreezer* a -80°C . Depois de descongeladas as placas, foram adicionados 200 μL de reagente CyQUANT e, após uma incubação de 5 minutos, foi feita a leitura de fluorescência em 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Gerou-se o gráfico pelo programa GraphPad Prism 8.0.2, e a análise utilizada foi a ANOVA (*one-way*) com significância definida como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA FOSFOLIPASE-D RECOMBINANTE E PERFIL PROTÉICO

Após a expressão e purificação da LiRecDT1, as amostras coletadas ao longo do processo de expressão (tempo 0h, 1h e 3,5h após indução com IPTG), junto ao marcador de massa molecular e proteína purificada, foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE 12,5%. O objetivo foi avaliar a expressão da PLD após a indução com IPTG e analisar a eficiência da purificação. Foi possível observar por meio do gel de poliacrilamida, que a PLD foi expressa na massa molecular predita de ~35 kDa (FIGURA 4), conforme demonstrado na literatura (Gremski *et al.*, 2010, 2014) e purificada com um alto grau de pureza. O próximo passo foi testar a atividade enzimática dessa enzima, para posteriores testes nas células EA.hy926.

FIGURA 4 - GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES REDUTORAS: PERFIL DE EXPRESSÃO DA LIRECDT1



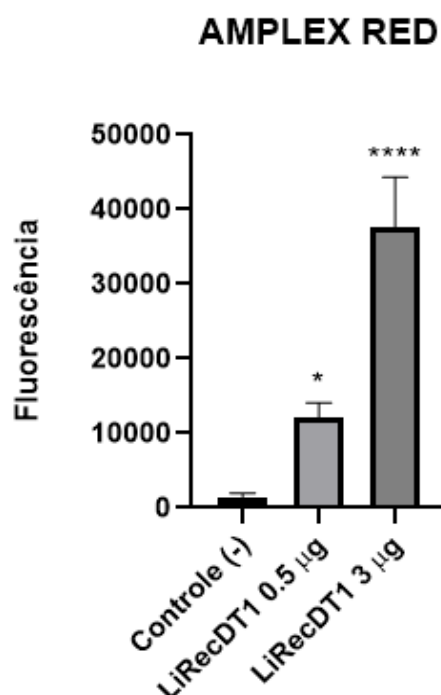
Gel de eletroforese corado em Azul de Coomassie. M (1): marcador de massa molecular; T0 (2): amostra no início da expressão sem indução; T1H (3): amostra após 1 hora de indução com IPTG; T3,5H (4): amostra após 3 horas e meia desde a indução com IPTG; PLD (5): proteína purificada após cromatografia de afinidade.

FONTE: A autora (2024).

4.2 AMPLEX RED

Para avaliar a atividade enzimática da PLD, utilizou-se um *kit* que possui um substrato, sendo ele a esfingomielina, um dos substratos de clivagem pela LiRecDT1. Foi possível observar que a PLD degradou a esfingomielina tanto na massa 0.5 μg quanto 3 μg da enzima (GRÁFICO 1). Portanto, foi confirmado, ao comparar os resultados da leitura de fluorescência da placa, que as enzimas estavam ativas e realizando sua atividade catalítica normalmente, havendo diferenças significativas (* para 0.5 μg e **** para 3 μg) entre PLD e o controle negativo. O controle negativo obteve uma pequena leitura por conta de reações não específicas dos reagentes do ensaio com o substrato e/ou possivelmente ruído de fundo na placa de leitura, resultando no gráfico uma leve fluorescência basal captada. Esse resultado era esperado por conta da alta interação e quebra do substrato presente no reagente pela PLD, de forma a mostrar a catálise de maneira concentração dependente.

GRÁFICO 1 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PLD



Atividade catalítica da LiRecDT1 em concentrações de 0.5 μg e 3 μg de toxina.

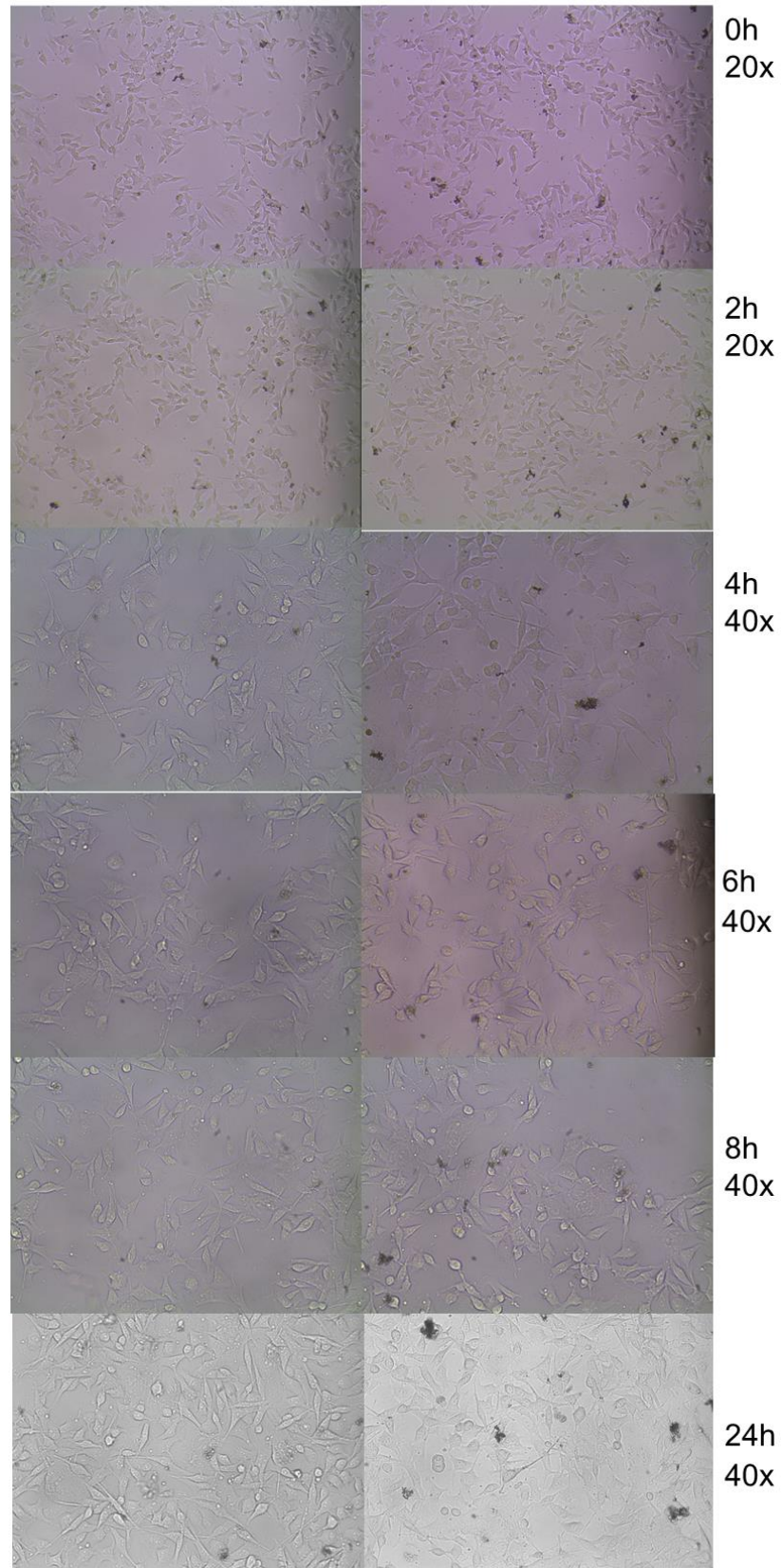
FONTE: A autora (2024).

4.3 ENSAIO DE MORFOLOGIA

A partir do ensaio de avaliação de citotoxicidade por meio de observação da morfologia celular, foi possível perceber a não alteração das células ao serem incubadas com a toxina, elas se mantiveram iguais ao seu respectivo controle sem tratamentos, de acordo com o tempo. Células endoteliais possuem um padrão alongado com prolongações celulares evidentes, sendo essas características fáceis de serem vistas nas imagens. Ademais, pode-se perceber que além de estarem iguais, o controle e o tratamento, no mesmo tempo, as imagens de 0h e 24h indicam a mesma morfologia por análises de tamanho e formas celulares (FIGURA 5). Esse resultado mostra grande diferença entre os tratamentos com o veneno de *L. intermedia* para a PLD isolada, onde em Veiga *et al.* (2001) e Paludo *et al* (2006), as células endoteliais RAEC tratadas com esse veneno perderam adesão ao substrato, retraíram seus prolongamentos e desaderiram umas das outras.

FIGURA 5 – IMAGENS DE MICROSCOPIA DE EA.HY926

PBS X PLD



FONTE: A autora (2024).

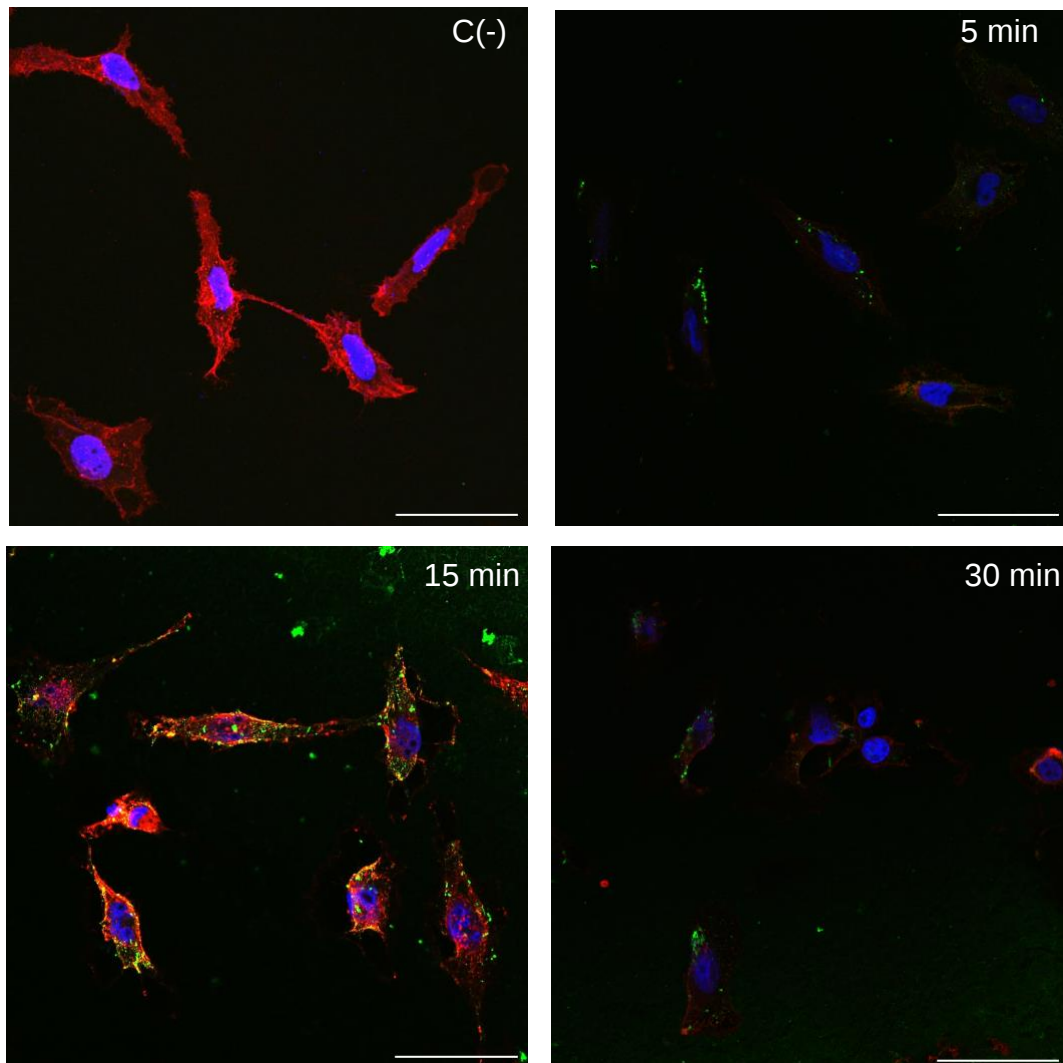
4.4 IMUNOFLOURESCÊNCIA CONFOCAL

Nesta técnica procuramos verificar se células expostas a PLD purificada são capazes de ligarem esta toxina na sua superfície, pois as células não estavam transparentizadas. Como resultados obtivemos boas imagens, com exceção da lamínula correspondente ao tempo de 1 hora tratada com a toxina, que foi perdida no processo por erros técnicos, porém os resultados encontrados nas outras lamínulas foram suficientes para evidenciar e criar uma hipótese a respeito da interação das células com a fosfolipase-D. Como já comentado, esse ensaio, *a priori*, foi realizado para descobrir se a PLD se ligava nas células; com isso, ao marcá-la com ALEXA 488, em verde, o núcleo com DAPI, em azul e a membrana com Lectina-WGA 594, em vermelho, foi possível hipotetizar que sim, a toxina se liga, mais especificamente na membrana plasmática, o que faz sentido ao analisar estudos como Murakami *et al* (2006) que evidenciam essa interação, principalmente focando nas estruturas das PLDs e sua ligação em lipídios nas membranas celulares. Inicialmente se observou a formação de microvesículas extracelulares/ectossomos. Além disso, percebeu-se também que as células com o passar do tempo produziram estruturas supramoleculares maiores, provavelmente por fusão dos ectossomos. Essas microvesículas podem ser observadas ao notar agrupamentos de PLD em verde na superfície das células; o que corrobora, de certa forma, com o descrito na literatura a respeito do veneno ter ação na superfície celular (Nowatzki *et al.*, 2010; Paludo *et al.*, 2006; Veiga *et al.*, 2001).

No controle negativo, nota-se apenas as membranas plasmáticas e o núcleo corado, com ausência de fluorescência verde, indicando que os anticorpos primário e secundário não foram ligados de forma inespecífica. No tempo de 5 minutos, já foi possível verificar a interação da PLD na membrana plasmática com agrupamentos bem marcados em verde, de forma heterogênea, com alguns focos mais destacados, mostrando que esta interação com a superfície das células é rápida. Já nas células que foram expostas por 15 minutos, percebeu-se um padrão diferente; a marcação em verde estava mais intensa e mais homogênea ao longo dos prolongamentos celulares, podendo perceber a intensa interação com a membrana plasmática na sobreposição das cores vermelha e verde resultando na coloração alaranjada que pode ser observada em alguns pontos da imagem. Na incubação com tempo de 30 minutos a marcação do verde não estava mais tão intensa quanto à de 15 minutos,

mostrando apenas algumas regiões marcadas e sugerindo que estas microvesículas formadas de alguma maneira são expulsas da membrana celular (FIGURA 6).

FIGURA 6 - IMAGENS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA NOS TEMPOS DE 1 HORA (CONTROLE), 5, 15 E 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.



Imagens em escala de 50 μm de 60x.

FONTE: A autora (2024).

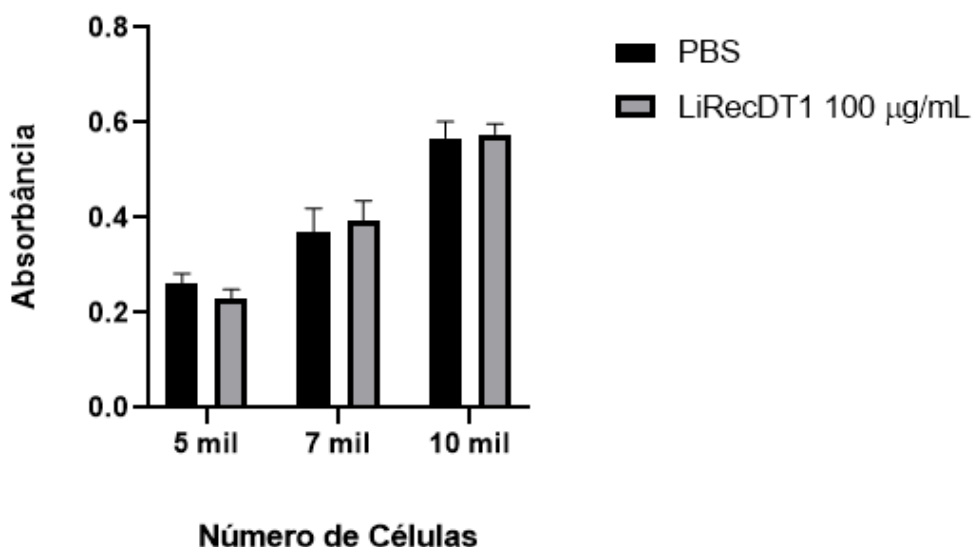
4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE: MTT

O ensaio utilizando o reagente MTT, quantifica o NADH proveniente da mitocôndria, verificando a viabilidade e o metabolismo celular, nesse caso frente à

toxina PLD. Os experimentos com 10^4 , 7×10^3 e 5×10^3 células expostas à 100 $\mu\text{g/mL}$ de toxina por 24 horas, resultaram em valores de absorbância próximos aos seus respectivos controles, além de mostrar proporção do aumento de absorbância e aumento do número de células, sendo variáveis diretamente proporcionais (GRÁFICO 2). Esses resultados, ao fazer a análise estatística ANOVA, não mostraram diferenças significativas, mostrando que a viabilidade celular não foi alterada e que a mitocôndria manteve seu funcionamento, diferente do observado na literatura em algumas linhagens celulares que diminuíram a viabilidade de forma significativa como eritrócitos e células renais (Chaves-Moreira *et al*, 2009; Chaim *et al*, 2006; Kusma *et al*, 2008), essa diferença de maneira geral ocorre possivelmente pela diferença na composição das membranas lipídicas e comportamento celular.

GRÁFICO 2 – ENSAIO DE VIABILIDADE POR MTT

MTT 24h - EA.hy926



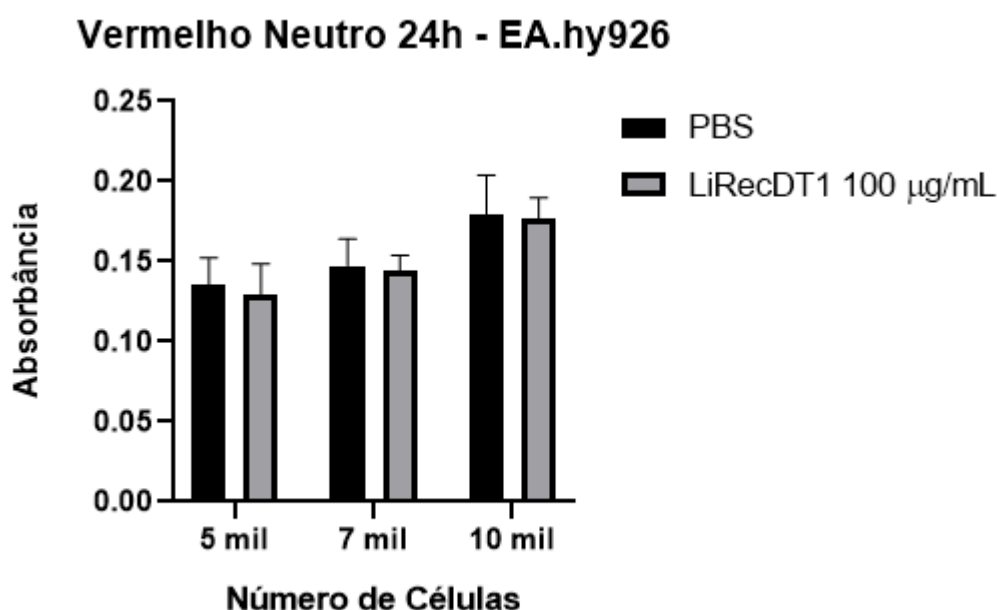
FONTE: A autora (2024).

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE: VERMELHO NEUTRO

O ensaio com o vermelho neutro, que é um corante avermelhado solúvel em água, representa o quão viável a célula está de acordo com a quantidade de corante que atravessa a membrana plasmática e se acumula dentro de lisossomos, por meio de ligações hidrofóbicas nos sítios aniônicos da matriz lisossomal, de células viáveis.

Portanto, quanto mais vermelho, maior a absorbância captada pelo equipamento, indicando mais células viáveis. Ao realizar esse experimento com 10^4 , 7×10^3 e 5×10^3 células EA.hy926 sendo plaqueadas, com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de toxina adicionada por poço, após 24 horas e ao realizar análises estatísticas pelo software prisma seguindo o modelo ANOVA, os resultados de absorbância se mostraram muito próximos ao comparar as células incubadas com a toxina com seus respectivos controles incubados apenas com PBS (GRÁFICO 3). Diante disso, pode-se inferir que a PLD não afetou a viabilidade celular de células EA.hy926 em relação ao seu metabolismo lisossomal.

GRÁFICO 3 - ENSAIO DE VIABILIDADE POR VERMELHO NEUTRO



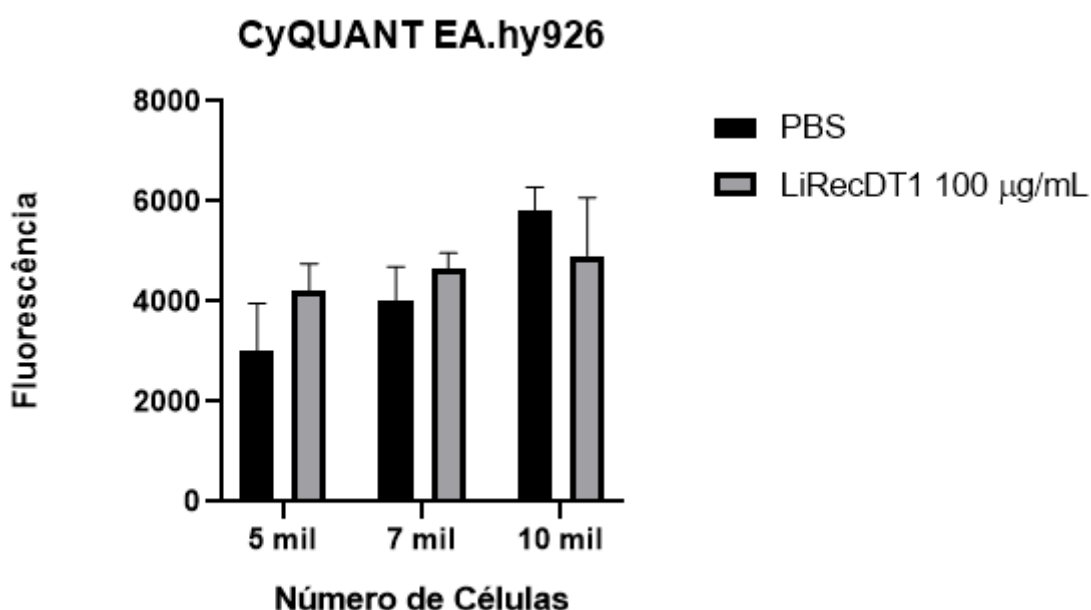
FONTE: A autora (2024).

4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO: CYQUANT

O ensaio com o reagente CyQUANT consiste na ligação do reagente na dupla-fita do DNA, resultando em liberação de fluorescência que é lida em um espectrofotômetro com 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Por comparação com grupo controle, é possível analisar a taxa de proliferação. A PLD, a partir dos resultados obtidos, não afetou a proliferação celular, pois ao comparar com o controle PBS, a leitura dos poços tratados com a toxina foi semelhante, sem diferenças significativas, ao testar 10^4 , 7×10^3 e 5×10^3 células com 100 $\mu\text{g/mL}$ de fosfolipase-D

por 24 horas de exposição (GRÁFICO 4). Portanto, o efeito da PLD de *L. intermedia* em EA.hy926, no contexto de proliferação celular, se mostrou contrastante com o que ocorreu em células B16-F10 (células de melanoma) e Wille., *et al* 2013, onde houve um aumento da proliferação nessa linhagem; isso se dá, possivelmente, por conta de diferenças nos comportamentos das células, padrões de expressão gênica e diferença estruturais, consequentemente.

GRÁFICO 4 - ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CYQUANT



FONTE: A autora (2024).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A isoforma recombinante de fosfolipase-D (PLD) do veneno de *Loxosceles intermedia* demonstrou uma interação interessante com a membrana celular já nos primeiros cinco minutos de exposição, sugerindo uma dinâmica específica e relativamente rápida. Esse comportamento, associado à formação de ectossomos e estruturas supramoleculares, seguido da expulsão das últimas da superfície celular, sem afetar negativamente a viabilidade, morfologia ou proliferação celular, indica uma relação única entre esta PLD e estruturas nas membranas celulares. Tais interações influenciam processos biológicos fundamentais, como sinalização intra e extracelular, modulação da matriz extracelular e alterações na expressão gênica, estabelecendo

um novo paradigma de estudo e abrindo perspectivas para o avanço do conhecimento em biologia e bioquímica celular e no entendimento do loxoscelismo.

Dessa forma, futuras investigações devem incluir as realizações de novos experimentos de exposições celulares a PLD por diferentes tempos e marcações para mapear a dinâmica da PLD, bem como o isolamento e análise detalhada das microvesículas extracelulares formadas, juntamente de outras estruturas supramoleculares associadas. Estudos voltados para a expressão gênica e mediadores inflamatórios gerados pela exposição à toxina também serão fundamentais na compreensão deste evento na sinalização da resposta inflamatória detectada durante o loxoscelismo.

Esses esforços não apenas ampliarão a compreensão do papel biológico da PLD, mas também trarão contribuições significativas para a biologia celular, o manejo do loxoscelismo e a ciência como um todo. A elucidação desses mecanismos poderá resultar em aplicações terapêuticas inovadoras como inibidores de formação de ectossomos, e estratégias eficazes para neutralizar os efeitos dessa toxina, além de potenciais descobertas para outras áreas de estudo, com outras linhagens celulares, tecidos e órgãos.

REFERÊNCIAS

- BARBARO, K. C. et al. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *Journal of Protein Chemistry*, v. 15, n. 4, p. 337-343, 1 maio 1996.
- BARRETTO, O. C. O.; CARDOSO, J. L.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 27, p. 264-267, 1 out. 1985.
- BOIA-FERREIRA, MARIANNA ; MORENO, KAMILA G. ; BASÍLIO, ALANA B. C. ; DA SILVA, LUCAS P. ; VUITIKA, LARISSA ; SOLEY, BRUNA ; WILLE, ANA CAROLINA M. ; DONATTI, LUCÉLIA ; BARBARO, KATIA C. ; Chaim, Olga M. ; GREMSKI, LUIZA HELENA ; VEIGA, SILVIO S. ; Senff-Ribeiro, Andrea . TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. *Cells* , v. 8, p. 1489, 2019.
- CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 211, n. 1, p. 64-77, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16005484/>. Acesso em: 10 abr 2023.
- CHAVES-MOREIRA, D., CHAIM, O. M., SADE, Y. B., PALUDO, K. S., GREMSKI, L. H., DONATTI, L., DE MOURA, J., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DA SILVEIRA, R. B., SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J Cell Biochem*. v. 107, p. 655-666, 2009.
- DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; et al. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, v. 44, n. 7, p. 693-709, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15500846/>. Acesso em: 24 abr. 2023.
- DE-BONA, E. et al. Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 146, p. 109759, 1 maio 2021.
- DEBONI, P. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA INDUZIDA POR FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE ARANHA-MARROM (GÊNERO *Loxosceles*): COM ÊNFASE NO EFEITO SOBRE A MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS. Curitiba, 58 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2017.
- DE OLIVEIRA, K. C. et al. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. *Toxicon*, v 37, n. 1, p. 217-221, jan. 1999.
- DE OLIVEIRA, K. C. et al. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*, v. 45, n. 4, p. 421-429, 15 mar. 2005.

FERRER, V. P. et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 5, p. e2206, 2 maio 2013.

GOMEZ-CAMBRONERO, J. New Concepts in Phospholipase D Signaling in Inflammation and Cancer. *The Scientific World Journal*, v. 10, p. 1356–1369, 1 jan. 2010.

GOMEZ, H. et al. *Loxosceles SPIDER VENOM INDUCES THE PRODUCTION OF a AND B CHEMOKINES: Implications for the Pathogenesis of Dermonecrotic Arachnidism*. *Inflammation*, v. 23, n. 3, 1999.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Molecular bioSystems*, v. 6, n. 12, p. 2403-2416, dez. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20644878/>. Acesso em: 10 abr. 2023.

GREMSKI, L. H. et al. Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. *Toxins*, v. 12, n. 3, p. 164, mar. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/3/164>. Acesso em: 12 abr. 2023.

GREMSKI, L. H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*. 2014 Jun; 83:91-120. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.02.023. Epub 2014 Mar 11. PMID: 24631373

GREMSKI, L. H. et al. Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins? *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 27, 2021.

JUSTA, H. C. DA et al. Induction of ectosome formation by binding of phospholipases D from *Loxosceles* venoms to endothelial cell surface: Mechanism of interaction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1870, n. 2, p. 159579, 14 nov. 2024.

JUSTA, H. C. DA et al. LALLT (*Loxosceles* Allergen-Like Toxin) from the venom of *Loxosceles intermedia*: Recombinant expression in insect cells and characterization as a molecule with allergenic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 164, p. 3984-3999, 1 dez. 2020.

KUSMA, J. Estudos da atividade nefrotóxica da toxina dermonecrótica (fosfolipase-D) do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*. **Ufpr.br**, 2022.

LEE, S.; LYNCH, KEVIN R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochemical Journal*, v. 391, n. 2, p. 317–323, 10 out. 2005.

MAGUIÑA VARGAS, C.; FIGUEROA VÁSQUEZ, V.; PULCHA UGARTE, R. Actualización sobre manejo de araneismo en Perú. **Revista Medica Herediana**, v. 28, n. 3, p. 200–207, 1 jul. 2017.

MARQUES-DA-SILVA, E. e FISCHER, M. L. [*Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana]. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 38, p. 331-335, 2005.

MCDERMOTT, M.; WAKELAM, M. J. O.; MORRIS, A. J. Phospholipase D. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, v. 82, n. 1, p. 225–253, 1 fev. 2004.

MOUTOUSSAMY, E. E. et al. Specificity of *Loxosceles* α clade phospholipase D enzymes for choline-containing lipids: Role of a conserved aromatic cage. **PLoS Computational Biology**, v. 18, n. 2, p. e1009871–e1009871, 18 fev. 2022.

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*, v. 280, p. 13658-13658, 2005.

MURAKAMI, M. T., FERNANDES-PEDROSA, M. F., DE ANDRADE, S. A., GABDOULKHAKOV, A., BETZEL, C., TAMBOURGI, D. V.; ARNI, R. K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary 57 relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 342, p. 323-329, 2006.

NOWATZKI, J., DE SENE, R. V., PALUDO, K. S., VEIGA, S. S., OLIVER, C., JAMUR, M. C., NADER, H. B., TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. *Toxicon*. v. 56, p. 535-543, 2010.

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

PRETEL, F. et al. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adalaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. *Toxicon*, v. 45, n. 4, p. 449-458, 15 mar. 2005.

ROTH, M. G. Molecular Mechanisms of PLD Function in Membrane Traffic. *Traffic*, v. 9, n. 8, p. 1233–1239, ago. 2008.

SCHEMCZSEN-GRAEFF, Z. et al. Description of a serpin toxin in *Loxosceles* (Brown spider) venoms: Cloning, expression in baculovirus-infected insect cells and functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 183, p. 1607–1620, 31 jul. 2021.

TAMBOURGI, D. V. et al. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *Journal of Immunology*, v. 155, n. 9, p. 4459-4466, 1 nov. 1995.

TAMBOURGI, D. V. et al. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology*, v. 107, n. 1, p. 93-101, 1 set. 2002.

TAMBOURGI, D. V. et al. Sphingomyelinases in the Venom of the Spider *Loxosceles intermedia* Are Responsible for both Dermonecrosis and Complement-Dependent Hemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 251, n. 1, p. 366-373, 9 out. 1998.

THEODORO, JOÃO LUCAS. Perfil de expressão dos transcritos de fosfolipases-D nas glândulas de veneno de aranhas *Loxosceles*. Ufpr.br, 2023.

VEIGA, S.S., Zanetti, V.C., Franco, C.R.C., Trindade, E.S., Porcionatto, M.A., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., 2001. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* 102, 229 - 237.

VUITIKA, L. et al. Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular And Cell Biology Of Lipids*, v. 1861, n. 9, p. 970-979, 1 set. 2016.

WILLE, A. C. M. et al. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, v. 67, p. 17-30, jun. 2013.

ZANETTI, V. C. et al. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, v. 13, n. 2, p. 135–148, 1 mar. 2002.

ANEXO 1: ARTIGO PUBLICADO COM CO-AUTORIA

Estes resultados fizeram parte do artigo publicado na revista Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, nomeado Induction of ectosome formation by binding of phospholipases D from *Loxosceles* venoms to endothelial cell surface: Mechanism of interaction, por Da Justa., *et al* (2024), onde me encontro como co-autora.



Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular
and Cell Biology of Lipids

Volume 1870, Issue 2, March 2025, 159579



Regular paper

Induction of ectosome formation by binding of phospholipases D from *Loxosceles* venoms to endothelial cell surface: Mechanism of interaction

Hanna Câmara da Justa ^a, Antonielle Beatriz Baldissera ^a, Mariana Izabele Machado ^a, Samira Hajjar Souza ^a, Nayanne Louise Costacurta Polli ^a, Marianna Boia-Ferreira ^a, Pedro Henrique de Caires Schluga ^a, Lucelia Donatti ^a, Ana Carolina M. Wille ^b, João Carlos Minozzo ^c, Luiza Helena Gremski ^a, Silvio S. Veiga ^a  