

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALYSSON HENRIQUE URBANSKI

FOSFOLIPASES-D NO LOXOSCELISMO: MECANISMOS MOLECULARES  
INDUZIDOS PELA INTERAÇÃO DE TOXINAS DO VENENO DE ARANHAS-  
MARRONS COM A SUPERFÍCIE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

CURITIBA

2016

ALYSSON HENRIQUE URBANSKI

FOSFOLIPASES-D NO LOXOSCELISMO: MECANISMOS MOLECULARES  
INDUZIDOS PELA INTERAÇÃO DE TOXINAS DO VENENO DE ARANHAS-  
MARRONS COM A SUPERFÍCIE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Monografia apresentada à disciplina  
Trabalho de Conclusão de Curso II como  
requisito parcial à conclusão do Curso de  
Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Meiri Chaim

Co-orientador: Me. Adriano Marcelo Morgon

CURITIBA

2016

## RESUMO

Acidentes com aranhas-marrons (gênero *Loxosceles*) são um problema de saúde pública no Brasil. As manifestações clínicas decorrentes do envenenamento por estas aranhas incluem dermonecrose com espalhamento gravitacional e manifestações sistêmicas, como hemólise intravascular disseminada e insuficiência renal aguda, podendo levar a morte. O veneno loxoscélico é uma mistura de proteínas e peptídeos de baixa massa molecular. Nesta mistura, destacam-se as fosfolipases-D. As fosfolipases-D sozinhas são capazes de induzir muitos dos sinais e sintomas induzidos pelo veneno total. Embora o papel das fosfolipases-D no envenenamento e sua atividade *in vitro* seja foco de vários estudos, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares nos quais se baseia sua toxicidade. Visando um melhor entendimento do loxoscelismo e o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas ou outras práticas biotecnológicas, este trabalho teve como objetivo a compreensão dos mecanismos moleculares e respostas celulares promovidas por isoformas recombinantes de fosfolipases-D de aranhas-marrons (*L. intermedia* e *L. gaucho*) após interação com células endoteliais de coelho *in vitro*. Para os ensaios *in vitro*, as toxinas foram primeiramente expressas, purificadas e avaliadas quanto a sua atividade enzimática sobre esfingomiélin. Visando avaliar os efeitos citotóxicos das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), estas foram expostas às toxinas durante diferentes intervalos de tempo. Análises morfológicas obtidas por microscopia de luz em microscópio invertido revelaram que algumas células apresentaram vacuolização citoplasmática após a exposição às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1. Para avaliar possíveis interações das toxinas recombinantes com microdomínios específicos de membrana, foi realizado o ensaio de fracionamento de membrana para identificação e purificação de balsas lipídicas, que se mostrou eficiente para a identificação e separação destes microdomínios. Porém, os resultados da análise de presumíveis interações de balsas lipídicas com as toxinas recombinantes não foram conclusivos, sendo ainda necessária a padronização e o aperfeiçoamento deste ensaio. A obtenção destes dados permitirá uma melhor compreensão de mecanismos moleculares que sustentam o papel citotóxico das fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles*.

Palavras-chave: Fosfolipase-D. Célula endotelial. Balsa lipídica.

## ABSTRACT

Accidents involving brown-spiders (*Loxosceles* genus) are a public health issue in Brazil. Clinical manifestations resulting from poisoning by those spiders include dermonecrosis with gravitational spread and systemic manifestations, such as disseminated intravascular hemolysis and acute renal failure, leading to death. The venom of *Loxosceles spiders* is a mixture of peptides and proteins of low molecular weight. Among these, there are the phospholipase-D, that are able to induce many of the effects and symptoms induced by whole venom. Although the role of phospholipase-D in the poisoning and its *in vitro* activity is subject of several studies, little is known about the molecular mechanisms which explain their toxicity. For a better understanding of loxoscelism, as well the development of new drug therapies or other biotechnological solutions, this study aimed the understanding of the molecular mechanisms and cellular responses promoted by recombinant isoforms of phospholipase-D from brown spiders (*L. intermedia* and *L. Gaucho*) upon interaction with rabbit endothelial cells *in vitro*. The toxins have been expressed, purified, and evaluated for their enzymatic activity and found suitable for *in vitro* assays. To evaluate the cytotoxic effect of recombinant toxins LiRecDT1 LgRec, rabbit aorta endothelial cells (RAEC) were exposed to these toxins during different time intervals. Morphological analysis obtained by light microscopy revealed that LiRecDT1 and LgRec1 triggered vacuolization in some cells. To evaluate possible interactions of recombinant toxins with specific membrane microdomains, we performed the membrane fractionation assay, which proved efficient for identification and separation of lipid rafts. However, we were unable to identify possible interactions of the recombinant toxins with lipid rafts, since the results of this assay were inconclusive, requiring further improvement and standardization of the protocol. Obtaining these data will allow a better understanding of molecular mechanisms sustaining the cytotoxic effect of phospholipase-D from *Loxosceles* genus spiders.

Key words: Phospholipase-D. Endothelial cell. Lipd raft.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>8</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
4.1 TRANSFORMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES EM <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS	14
4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES	15
4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES POR SDS-PAGE	16
4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD	16
4.5 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE FOSFOLIPASES-D	17
4.6 CULTIVO CELULAR	17
4.7 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA BALSAS LIPÍDICAS DE CÉLULAS RAEC POR FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE OU NYCODENZ	18
4.8 REAÇÕES DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	19
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>21</b>
5.1 EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES	21
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	24
5.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1, LiRecDT1H12A E LgRec1 EM LINHAGEM DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO (RAEC) POR MICROSCOPIA DE LUZ	25

5.4 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA BALSAS LIPÍDICAS DE CÉLULAS POR FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE NYCODENZ.....	31
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas popularmente como aranhas-marrons, devido à sua coloração. Possuem distribuição global, com 11 espécies encontradas no Brasil e 4 ocorrendo no Paraná, sendo estas: *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. hirsuta* (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; FISCHER, 2008; FUTRELL, 1992; MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005; PLATNICK, 2013).

O envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* é descrito como loxoscelismo, o qual é um problema de saúde pública no Brasil e no Paraná (CHAIM *et al.*, 2011b; FUTRELL, 1992; ISBISTER; FAN, 2011)

O veneno loxoscélico é descrito como uma mistura de proteínas e peptídeos de baixa massa molecular, com ações tóxicas e enzimáticas (FUTRELL, 1992; GREMSKI *et al.*, 2014; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Dentre essas proteínas se destacam as fosfolipases-D, que sozinhas podem induzir muitos dos sinais e sintomas desenvolvidos pelo veneno (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2006, 2011b; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007). Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares de sua ação citotóxica (NOWATZKI *et al.*, 2012). Sua toxicidade pode estar relacionada à sua interação com microrregiões específicas de superfície celular, como balsas lipídicas (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; NOWATZKI *et al.*, 2010).

Balsas lipídicas são microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios, localizadas na membrana plasmática. Estão envolvidas em diversos processos biológicos e em respostas adaptativas a estímulos fisiopatológicos, incluindo reorganização proteica para os eventos de endocitose e exocitose, por exemplo (MUNRO, 2003).

O desenvolvimento de terapias mais eficientes para os acidentes loxoscélicos depende da melhor compreensão dos processos promovidos pelas toxinas do veneno. A identificação de respostas celulares e mecanismos moleculares ativadas pela exposição ao veneno e as toxinas contribuirá para o melhor entendimento do loxoscelismo e seus alvos moleculares, bem como outras práticas biotecnológicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender os mecanismos moleculares e respostas celulares promovidas pela toxina dermonecrótica (fosfolipase-D) de aranhas-marrons (*Loxosceles intermedia* e *Loxosceles gaucho*) após interação com células endoteliais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtenção de três isoformas recombinantes de fosfolipase-D de *L. intermedia* e *L. gaucho* (LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LgRec1) em suas formas puras e ativas por meio de expressão heteróloga em quantidade suficiente para os testes *in vitro*;

Determinar a relação de citotoxicidade de fosfolipases-D com componentes de membrana plasmática de células endoteliais;

Verificar alterações morfológicas resultantes da interação das fosfolipases-D com células endoteliais;

Avaliar os possíveis alvos específicos da interação de fosfolipases-D em células endoteliais, tais como componentes da membrana plasmática ou da matriz extracelular.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As aranhas do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) são popularmente conhecidas como aranhas-marrons por apresentarem uma coloração que varia do marrom-claro ao marrom-escuro. São também conhecidas como aranhas-violino, devido ao padrão de pigmentação presente na porção dorsal de seu cefalotórax assemelhar-se ao instrumento. Essas aranhas são pequenas, com tamanho variando de 1 a 5 centímetros, e possuem seis olhos dispostos em pares formando um semicírculo (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; GREMSKI *et al.*, 2014; VETTER, 2008).

As aranhas-marrons possuem distribuição global, estando presentes na América Central, América do Norte, América do Sul, Europa, África, Ásia e Oceania. No Brasil, observa-se a existência de 11 espécies de aranha-marrom, com quatro delas apresentando ocorrência no Paraná: *L. intermedia*; *L. gaucho*; *L. laeta* e *L. hirsuta* (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; FISCHER; BAZILIO; SANTOS, 2009; MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005; PLATNICK, 2013). Essa ampla distribuição pode ser consequência da capacidade dessas aranhas suportarem temperaturas entre 8°C e 43°C. Além disso, elas podem viver por longos períodos com ausência de água ou alimento (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). Por serem animais noturnos e preferirem ambientes secos, escuros e calmos, essas aranhas se adaptaram muito bem às condições domiciliares. No ambiente doméstico, elas podem ser encontradas atrás de quadros, móveis e até mesmo dentro de roupas e sapatos, sempre ao abrigo de luz direta (TAMBOURGI; GONÇALVES-DE-ANDRADE; VAN DEN BERG, 2010). Consequentemente, acidentes envolvendo aranhas-marrons no Brasil, e principalmente no estado do Paraná, são um problema de saúde pública, uma vez que o estado é o que mais notifica acidentes loxoscélicos, apresentando uma média anual de quase 4500 notificações por ano entre 2010 e 2014 (GREMSKI *et al.*, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE; DATASUS, 2015).

O termo loxoscelismo é utilizado para caracterizar as manifestações clínicas decorrentes do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*. O loxoscelismo pode se apresentar em dois quadros independentes e não exclusivos: cutâneo e sistêmico (FUTRELL, 1992; ISBISTER; FAN, 2011). O loxoscelismo cutâneo é o quadro clínico diretamente relacionado ao local da picada, apresenta sinais e sintomas

como: edema, eritema, equimose, isquemia do tecido local, lesões dermonecroticas com espalhamento gravitacional (característico do loxoscelismo) e a formação de placas marmóreas, que são caracterizadas por uma extensão de tecido isquêmico circundada por um halo vermelho e zonas pálidas (CHATZAKI *et al.*, 2012; ISBISTER; FAN, 2011; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). O loxoscelismo sistêmico é muito menos comum do que o cutâneo, porém potencialmente mais severo. O quadro sistêmico é caracterizado por coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular (responsável pelo desenvolvimento de anemia hemolítica, hemoglobinúria e icterícia) e insuficiência renal aguda, que pode levar a óbito (DA SILVA *et al.*, 2004; MÁLAQUE *et al.*, 2002; TAMBOURGI; GONÇALVES-DE-ANDRADE; VAN DEN BERG, 2010).

O veneno loxoscélico é um líquido cristalino produzido por um par de glândulas localizado no cefalotórax dessas aranhas e sua composição bioquímica ainda continua sob investigação. Porém, diversos estudos mostram que o mesmo consiste em uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos, principalmente proteínas e peptídeos de baixa massa molecular (5-40 kDa) com ações tóxicas e/ou enzimáticas (FUTRELL, 1992; GREMSKI *et al.*, 2014; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Dentre as toxinas já identificadas pertencentes ao veneno, podem ser citadas: fosfatase alcalina, 5'-nucleotídeo fosfohidrolases (FUTRELL, 1992), hialuronidases (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; FERRER *et al.*, 2013; FUTRELL, 1992; YOUNG; PINCUS, 2001), serino-proteases (VEIGA *et al.*, 2000b), metaloproteases (VEIGA *et al.*, 2000a; YOUNG; PINCUS, 2001), nucleosídeos sulfatados (SCHROEDER *et al.*, 2008) e fosfolipases-D (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2002, 2006, 2007b; FUTRELL, 1992).

Aos membros da família das fosfolipases-D, também denominadas toxinas dermonecroticas, é atribuída a capacidade de reproduzir a maior parte dos efeitos biológicos observados pela ação do veneno loxoscélico. Estudos mostram que uma toxina dermonecrotica recombinante de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT1) foi capaz de estimular dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, distúrbio renal, aumentar permeabilidade vascular e gerar uma resposta inflamatória (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2006, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007). Já uma toxina dermonecrotica recombinante de *Loxosceles gaucho* (LgRec1) mostrou alta atividade dermonecrotica, capacidade de promover agregação plaquetária e hemólise. Além disso, anticorpos produzidos contra

essa toxina recombinante conseguiram neutralizar a dermonecrose causada pelo veneno total de *L. gaucho* (MAGALHÃES *et al.*, 2013)

Primeiramente, essas toxinas foram denominadas esfingomielinases-D, devido à observação de sua atividade hidrolítica sobre esfingomielina (FUTRELL, 1992). Posteriormente, foi-se observado que estas enzimas também atuam sobre outros substratos fosfolipídicos, sendo então denominadas fosfolipases-D (LEE; LYNCH, 2005).

Dentre os lipídios de membrana que são alvos das fosfolipases-D loxoscélicas, destacam-se a lisofosfatidilcolina e a esfingomielina. Usualmente, a atividade enzimática destas toxinas é mensurada pela liberação de colina após a hidrólise do substrato. Além de colina, a hidrólise de lisofosfatidilcolina e esfingomielina resulta em produtos secundários como ácido lisofosfatídico (LPA) e ceramida-1-fosfato (C1P), respectivamente (LAJOIE *et al.*, 2013; LEE; LYNCH, 2005; TAMBOURGI; GONÇALVES-DE-ANDRADE; VAN DEN BERG, 2010). Tanto a C1P quanto o LPA são metabólitos lipídicos bioativos e podem ser parcialmente responsáveis pela toxicidade das fosfolipases-D por ativarem cascatas de sinalização relacionadas a alterações fisiopatológicas (CHAIM *et al.*, 2011a). Já foi identificado que a produção de LPA pode ocorrer através da ação de fosfolipases sobre eritrócitos ou plaquetas ativadas (AOKI *et al.*, 2002; FOURCADE *et al.*, 1995; SANO *et al.*, 2002) ou pela ação de fosfolipases-D sobre a lisofosfatidilcolina (STODDARD; CHUN, 2015; YUNG; STODDARD; CHUN, 2014).

O ácido lisofosfatídico (LPA) induz diversas respostas biológicas ou patológicas por sinalização por meio de receptores acoplados à proteína-G, como agregação plaquetária, hiperpermeabilidade endotelial e respostas pró-inflamatórias (ANLIKER; CHUN, 2004; LEE; LYNCH, 2005). Também está envolvido na regulação da diferenciação e proliferação celular (PUSTILNIK *et al.*, 1999), adesão e migração celular (LAJOIE *et al.*, 2013), rearranjo do citoesqueleto (MOOLENAAR, 1995), interações célula-célula (FUKUSHIMA *et al.*, 2002), além de cicatrização e tumorigênese (KIM *et al.*, 2006).

De maneira semelhante, a C1P, produzida pelas fosfolipases-D a partir da hidrólise de esfingomielina presente na membrana plasmática, estimula a liberação de ácido araquidônico e a formação de prostaglandina E2 (CHALFANT; SPIEGEL, 2005; PETTUS *et al.*, 2003). Por isso, supõe-se que a C1P tenha papel no quadro inflamatório induzido pelas fosfolipases-D loxoscélicas, uma vez que pode induzir a

síntese moléculas pró-inflamatórias como NF-kB, IL-8 e outras citocinas (CHAIM *et al.*, 2011a; DRAGULEV *et al.*, 2007).

Os efeitos do veneno total de *Loxosceles intermedia* sobre células endoteliais já foram descritos anteriormente (CHAIM *et al.*, 2011a; NOWATZKI *et al.*, 2010, 2012; PALUDO *et al.*, 2006). O endotélio vascular tem como funções primárias a manutenção do fluxo sanguíneo (BUSSE; FLEMING, 2006), o controle da permeabilidade vascular (MINSHALL; MALIK, 2006) e a estabilização de leucócitos circulantes (LEY; REUTERSHAN, 2006). Porém, o endotélio pode se modificar para promover as etapas envolvidas em um processo inflamatório, como o recrutamento de leucócitos para o local da lesão (POBER; SESSA, 2007). Estudos demonstraram que o veneno é capaz de agir sobre essas células, levando a alterações morfológicas como retração celular, aumento de filopódios e desadesão da matriz extracelular, além da ativação de plaquetas e leucócitos, e aumento da permeabilidade dos vasos (NOWATZKI *et al.*, 2010; PALUDO *et al.*, 2006). Foi observado que algumas toxinas do veneno de *L. intermedia* são endocitadas por células endoteliais e transportadas aos lisossomos, embora não causando danos à integridade estrutural destes (NOWATZKI *et al.*, 2010). Segundo os autores, os efeitos citotóxicos do veneno loxoscélico em células endoteliais podem estar relacionados a outros eventos que não a sua internalização. Sugere-se, então, que a superfície celular e ligações extracelulares sejam importantes no processo de citotoxicidade observado, uma vez que as toxinas de *L. intermedia* induziram uma diminuição na quantidade de glicoconjugados na superfície celular (NOWATZKI *et al.*, 2010).

A PLD é capaz de induzir efeitos semelhantes aos do veneno total, como alterações na organização, assimetria e fluidez da membrana plasmática com translocação de fosfatidilserina para a face extracelular (GOMEZ-CAMBRONERO, 2010; MCDERMOTT; WAKELAM; MORRIS, 2004; ROTH, 2008). Além disso, eritrócitos humanos expostos à PLD recombinante de *L. intermedia* apresentaram agregação de microdomínios ricos em colesterol, o que pode levar à atividade de rotas de sinalização intracelular (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009).

Balsas lipídicas são microdomínios de membrana ricas em colesterol e esfingolipídios, localizadas na membrana plasmática (MUNRO, 2003). Esses microdomínios estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos, tais como cascatas de sinalização, apoptose, adesão e migração celular, organização do citoesqueleto e organização proteica durante endocitose e exocitose. Além disso, as

balsas lipídicas parecem ser a porta de entrada celular de diversos vírus, bactérias e toxinas. Além das balsas lipídicas, outro ponto de entrada para vírus, bactérias e toxinas podem ser as plataformas de ceramida (ALBINET *et al.*, 2013; MUNRO, 2003). Plataformas são grandes domínios de membrana onde há o acúmulo de ceramidas, e são importantes para a agregação, aprisionamento ou exclusão de moléculas receptoras e de sinalização intracelular. Dessa forma, a produção destes domínios é capaz de reorganizar a sinalização celular (HENRY *et al.*, 2013).

Dentre as toxinas que interagem com estruturas específicas de membrana, como balsas lipídicas, e são posteriormente internalizadas pela célula, podemos citar: toxina da cólera (KIRKHAM; PARTON, 2005; TORGERSEN *et al.*, 2001), toxina Shiga (KOVBASNJUK; EDIDIN; DONOWITZ, 2001) e neurotoxina do tétano (HERREROS; NG; SCHIAVO, 2001). Após internalizadas, as toxinas podem ser direcionadas para o sistema endossomo-lisossomo ou para caveolossomos (KIRKHAM; PARTON, 2005). A citotoxicidade exercida por elas depende de sua via pós-endocítica, através da degradação por lisossomos ou translocação para o retículo endoplasmático com subsequente liberação de moléculas bioativas no citosol (KIRKHAM; PARTON, 2005).

Internalizações auto-induzidas de toxinas são altamente dependentes de suas interações com glicosfingolipídios. A toxina Shiga, por exemplo, interage com a membrana promovendo a agregação de seus receptores glicosfingolipídeos no folheto externo, o que leva a uma formação de invaginações tubulares, permitindo a entrada da toxina na célula (RÖMER *et al.*, 2007). Observou-se que a toxina dermonecrótica induz a uma reorganização da membrana plasmática em eritrócitos *in vitro*, levando a agregação de balsas lipídicas (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). Nesse contexto, além das interações na superfície celular, outro fator que pode contribuir para o desenvolvimento de toxicidade das fosfolipases-D é a possível internalização da toxina pela presença de receptores nesses domínios de membrana.

Em um estudo com fosfolipase-D de *Streptomyces chromofuscus* (VAN DIJK *et al.*, 1998), observou-se que a toxina foi capaz de induzir mobilização de  $Ca^{2+}$ , fosforilação de tirosina e polimerização de actina, eventos que estão envolvidos na internalização de balsas lipídicas (KIRKHAM; PARTON, 2005). Tanto células endoteliais de aorta de coelho em cultivo expostas ao veneno total de *L. intermedia* (PALUDO *et al.*, 2006), quanto eritrócitos expostos à toxina dermonecrótica recombinante (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011) apresentaram os mesmos eventos

citados. Assim, é possível sugerir que a PLD, ao interagir com a membrana de células, pode iniciar eventos que levem à sua internalização.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TRANSFORMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES EM *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS

As toxinas utilizadas nesse trabalho foram produzidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho*, segundo protocolo de Chaim e colaboradores (2006). As construções em vetor de expressão pET-14b da toxina dermonecrótica de *L. intermedia* (LiRecDT1) e de sua isoforma com mutação sítio-dirigida no sítio catalítico (LiRecDT1 H12A) (CHAIM *et al.*, 2011a; KUSMA *et al.*, 2008) foram obtidas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. A construção em vetor de expressão pAE da toxina dermonecrótica de *L. gaucho* (LgRec1) foi disponibilizada pela Dr<sup>a</sup>. Katia Cristina Barbaro, do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan (MAGALHÃES *et al.*, 2013). A escolha destas três isoformas recombinantes se deu para a comparação dos efeitos promovidos por toxinas de diferentes espécies (LiRecDT1 e LgRec1) e para a observação da correlação destes efeitos com a atividade catalítica das toxinas, uma vez que a LiRecDT1 H12A possui uma mutação pontual que é responsável por drástica diminuição de atividade catalítica da fosfolipase-D (KUSMA *et al.*, 2008).

Previamente à expressão das toxinas recombinantes, as construções foram transformadas por eletroporação em cepa bacteriana eletrocompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Após a transformação, as bactérias foram ressuspensas em meio SOC (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10mM; glicose 0,2 M) e incubadas a 37°C por 1 hora, constituindo a fase de recuperação. Em seguida, foi realizado o plaqueamento das mesmas em duas placas constituídas de meio LB ágar (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; ágar-ágar 15 g/L), ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), sendo a primeira placa referente a uma fração de 100 µL da solução contendo as bactérias transformadas, e a segunda placa referente a 900 µL. O plaqueamento foi realizado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37°C por 16 horas (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2013).

## 4.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES

Para a expressão de cada toxina recombinante, a partir de uma colônia isolada das placas obtidas após a transformação, foi realizado um pré-inóculo contendo 12 mL de meio LB-líquido (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L), ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Cada pré-inóculo foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação constante de 200rpm. Após o crescimento das culturas, foi realizado um inóculo a partir da amostra anterior utilizando a razão 1:100 (cultura do pré-inóculo:meio LB-líquido). Após cada cultura atingir a densidade óptica entre 0.4 e 0.6 medida em 550 nm; a indução da expressão das proteínas recombinantes foi realizada utilizando 0,05 mM de β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) a 30°C por 3,5 horas (para LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A) ou 1 mM de IPTG a 37°C por 4 horas (para LgRec1). Foram coletadas amostras nos tempos inicial (T0h) e final (T3,5h ou T4h) de expressão, as quais foram centrifugadas por 3 minutos a 4000 xg. A fração solúvel de cada amostra foi descartado e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após o tempo de expressão, as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo e centrifugada por 7 minutos a 7000 xG. O precipitado foi ressuscitado em tampão de ligação (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM) e cada amostra foi incubada com lisozima 1 mg/mL por 30 minutos a 4°C. Após, as amostras foram submetidas a lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos de 1000 psi cada) e então centrifugadas a 9000 xG por 30 minutos. A fração solúvel foi separada do precipitado e ambos foram mantidos a 4°C. Após a lise, a fração solúvel referente a cada expressão foi incubada com resina de Ni-NTA Agarose previamente equilibrada com tampão de ligação (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10mM) por 1 hora a 4°C sob agitação de 6 rpm. Em seguida, foram realizadas sucessivas lavagens com tampão de lavagem (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM). A proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM) (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2013).

### 4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES POR SDS-PAGE

A fim de analisar os resultados das expressões da LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LgRec1, foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida 12,5% contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras (contendo 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol). A solução de poliacrilamida contendo os catalisadores APS e TEMED foi colocada entre placas de vidro e isolada com uma camada de isobutanol. Após a polimerização, foi removida a camada de água e isobutanol acima do gel com auxílio de papel filtro. A solução de empacotamento, contendo 5% de poliacrilamida e os catalisadores, foi colocada acima do gel e nela foi posicionado o pente para formação dos poços. Após a polimerização, o pente foi removido e os poços secos com auxílio de papel filtro. A separação das proteínas foi obtida mediante aplicação de corrente de 25 mA constante, até a separação total das mesmas. Os géis foram corados em solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol. Em seguida, os géis foram observados sob luz branca e foto documentados em *scanner* Epson Perfection 3490 Photo (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009).

### 4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

A dosagem da concentração de proteínas recombinantes obtidas foi realizada através do método de Azul de Coomassie, como descrito por Bradford, 1976. A absorbância foi obtida em 610 nm em leitor ELISA (Meridian, ELx 800, Auto Reader Diagnostics inc, EUA).

#### 4.5 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE FOSFOLIPASES-D

As amostras das toxinas dermonecróticas recombinantes foram avaliadas frente a atividade hidrolítica de lipídios utilizando kit para detecção indireta da liberação de colina. O ensaio preconiza a detecção da atividade das proteínas recombinantes usando o reagente 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazine Amplex Red® (Molecular Probes, Eugene, EUA), um reagente fluorogênico sensível para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cada toxina foi incubada (10 µg) com o substrato lipídico esfingomielina, sendo a mesma hidrolisada gerando ceramida-1-fosfato e colina. A colina por sua vez, é oxidada pela enzima colina oxidase à betaina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença da peroxidase reage com o *Amplex red* estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o resorufin. As reações foram realizadas em triplicatas, sendo as amostras incubadas a 37°C por 1 hora. Em seguida, a fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro (M200 Infinite - TECAN) usando comprimento de onda de excitação em 560 nm e emissão em 590 nm (CHAIM *et al.*, 2011a).

#### 4.6 CULTIVO CELULAR

O modelo de estudo escolhido para o projeto foi as células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) (BUONASSISI, 1973), as quais foram mantidas em meio F12 (mistura de nutrientes Ham's F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com L-glutamina, suplementado com bicarbonato de sódio (14 mM), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), antibiótico (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) provenientes da Sigma (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em estufa à 37°C com uma atmosfera úmida, sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. O subcultivo celular foi realizado primeiramente através de 3 lavagens com solução de EBSS (solução salina balanceada de Earl). Em seguida, foi adicionado solução de pancreatina diluída em EBSS (0,25% massa/volume). O complexo enzimático de pancreatina (também conhecida como

viocase) é composto por collagenases, elastases, esterases, nucleases e peptidases. Este complexo é extraído do pâncreas suíno e foi adquirido da Gibco (Life Technologies Rockville, MD, EUA). As células permaneceram sob ação enzimática por um período de 30 minutos. A seguir, a suspensão de células foi diluída em meio F12 contendo 10% de SFB, para inibir a ação enzimática. As células foram então coletadas por centrifugação, ressuspensas novamente em meio F12 contendo 10% de SFB e cultivadas em frascos provenientes da Kasvi. Estoques celulares foram mantidos no nitrogênio líquido, armazenados em tubos adequados, em solução de congelamento (90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Sigma–Aldrich) em meio F12).

Para a avaliação das alterações morfológicas desencadeadas pela exposição das células às fosfolipases-D recombinantes, 10000 células foram plaqueadas por poço em placa de 24 *wells*, cultivadas por 48 horas para adesão e produção de matriz, submetidas à situação de *starvation*, onde não há a presença de soro fetal bovino no meio, por 16 horas e em seguida foram incubadas com 50 µg/ml de cada toxina recombinante, em duplicatas, em um total de 300µl de meio F12 por poço, por um período de no máximo 24 horas (FRESHNEY, 2010).

#### 4.7 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA BALSAS LIPÍDICAS DE CÉLULAS RAEC POR FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE OU NYCODENZ

Foi realizada a purificação de balsas lipídicas seguindo protocolo adaptado (KESHET *et al.*, 2000; SOUZA, 2012) para o estudo de proteínas residentes de microdomínios que possam ser importantes na interação das fosfolipases-D. As células endoteliais (expostas ou não às toxinas recombinantes (50 µg/ml)) em cultivo foram coletadas em suspensão após exposição à viocase (como descrito no item anterior), contadas em câmara de Neubauer para a padronização da quantidade de  $1,0 \times 10^7$  células por ensaio. As células foram então homogeneizadas em tampão TNE gelado (NaCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 5 mM e Triton X-100 1% acrescido de coquetel de inibidores de proteases) e incubadas por 30 minutos em banho de gelo. O lisado foi centrifugado por 5 minutos a 500x g a 4°C e o sobrenadante

coletado. Em seguida, a amostra foi misturada com igual volume de uma solução de 70% Nycodenz AG (Axis-Shield) (m:v) em tampão TNE e colocada em tubo de ultracentrífuga. Sobre este lisado montou-se um gradiente linear de Nycodenz de 8% a 35%. A amostra foi ultracentrifugada por 4 horas a 4°C a 200000 xg em rotor sem ângulo fixo (Optima X Beckman Coulter). Treze frações de 180 µL foram coletadas do topo até o fundo do tubo e suas concentrações proteicas definidas pelo ensaio de micro BCA (*Micro BCA Protein Assay Kit* –Thermo Scientific), descrito por Smith e colaboradores (1985). Alíquotas contendo 1 µg de cada fração foram separadas em SDS-PAGE 12,5% e analisadas por reações de *Western Blotting* para a identificação de quais destas continham flotilina, uma proteína residente de balsas lipídicas (BICKEL *et al.*, 1997). Dessa forma, as balsas lipídicas purificadas foram imunodetectadas com anticorpos anti-flotilina-1 (Santa Cruz Biotechnology) e as demais frações foram combinadas e consideradas como frações solúveis em Triton X-100 1% a 4°C.

#### 4.8 REAÇÕES DE *WESTERN BLOTTING*

Os ensaios de *Western Blotting* foram realizados para avaliar, detectar e identificar a presença de proteínas recombinantes (LiRecDT1, LiRecDT1H12A e LgRec1) na superfície de células endoteliais RAEC, buscando o entendimento da interação das toxinas em porções da membrana e/ou frações subcelulares. A fim de identificar as frações de membrana provenientes da purificação por gradiente de Nycodenz que continham balsas lipídicas, essas foram detectadas através da avaliação da presença de flotilina.

Para os ensaios, as frações de membrana foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) e então as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose por 15 minutos à voltagem constante (15V) no aparelho Trans-Blot® SD Cell (221BR 50624). O bloqueio da membrana foi realizado com uma solução de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé) 3% (m/v) em PBS por 2 horas. Após, a membrana foi incubada por 16 horas, 4 °C, com anticorpos primários anti-flotilina-1 (Santa Cruz Biotechnology), para a identificação de frações contendo balsas lipídicas, na diluição de 1:250 na mesma solução de bloqueio. Após

5 lavagens de 3 minutos com o tampão de bloqueio, as membranas foram então incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (*Goat anti-rabbit IgG*, Millipore), conjugado à peroxidase, por 1 hora à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, a reação foi revelada com o substrato do kit *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific). Após isso a membrana foi reutilizada e, para isso, os anticorpos foram removidos utilizando-se solução NaOH 1M por 30 segundos, seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos. Então, a membrana foi submetida novamente ao bloqueio e incubação com anticorpos, dessa vez para identificação das toxinas recombinantes. Para tal, foi utilizado soro para identificação de fosfolipases recombinantes (produzido em camundongos por nosso grupo) como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (*Goat anti-rabbit IgG*, Sigma) como secundário. A revelação se deu como descrito acima. (TOWBIN *et al.* 1979; HARLOW e LANE, 1988).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

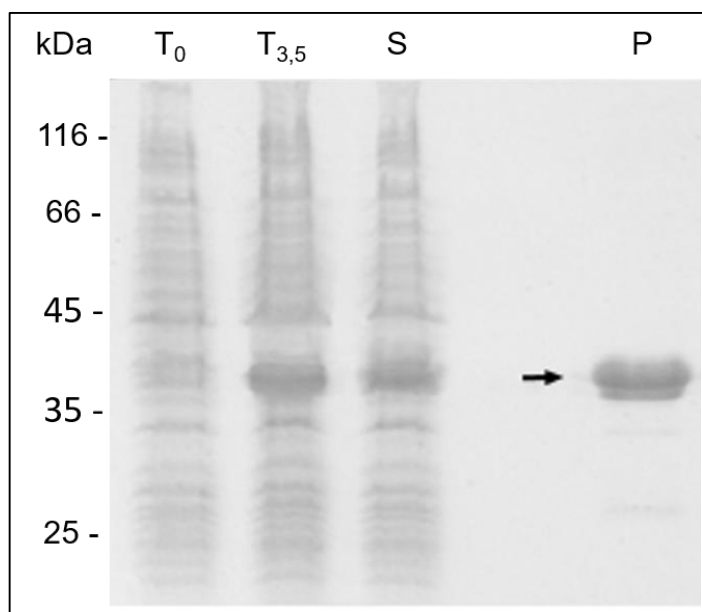
### 5.1 EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES

O veneno loxoscélico é uma complexa mistura de compostos biologicamente ativos, com ações tóxicas e/ou enzimáticas (FUTRELL, 1992; GREMSKI *et al.*, 2014; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Dentre as toxinas presentes no veneno, as fosfolipases-D, ou toxinas dermonecróticas, são as mais estudadas, uma vez que são capazes de induzir sozinhas muitos dos sinais e sintomas do loxoscelismo (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2006, 2011b; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2007). Porém, como o volume de veneno coletado das aranhas é relativamente baixo (poucos microlitros), a massa proteica obtida desta maneira costuma ser baixa. Nesse contexto, alternativas biotecnológicas, como a expressão heteróloga de toxinas recombinantes, foram desenvolvidas para superar obstáculos como as baixas quantidades de veneno obtidas por coleta, resultando em quantidades consideráveis de toxinas puras e em suas isoformas ativas (CHAIM *et al.*, 2011b).

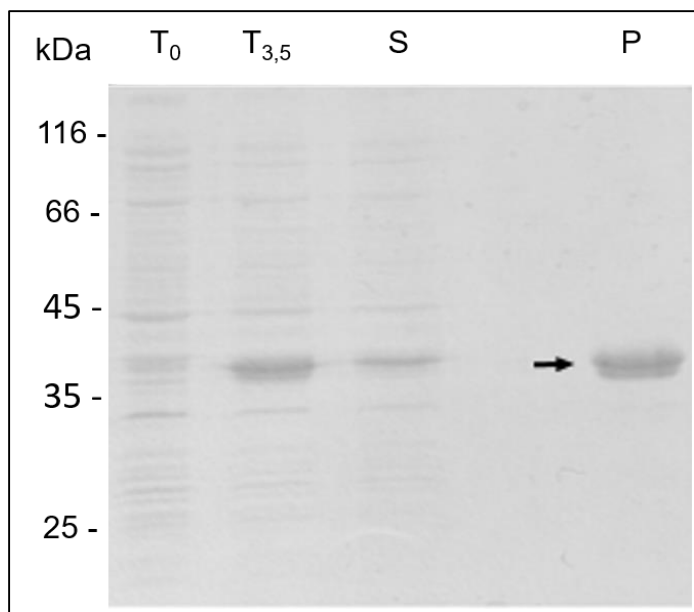
A bactéria *E. coli* foi utilizada como sistema precursor de expressão de proteínas recombinantes e tem sido o sistema de expressão heteróloga mais utilizado no mundo (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008). Suas principais vantagens, em comparação a outros sistemas, como o uso dos eucariotos, são a simplicidade, rapidez e baixo custo (BRONDYK, 2009; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008).

A partir das construções LiRecDT1/pET14-b, LiRecDT1 H12A/pET-14b e LgRec1/pAE, foram realizadas as expressões de isoformas ativas e mutada de Fosfolipase-D em cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. A fim de avaliar a expressão e solubilidade das proteínas recombinantes, foram coletadas amostras de antes da indução com IPTG (tempo 0h), após a expressão (tempo 3,5h ou 4h), do sobrenadante após a lise bacteriana, e das toxinas purificadas através de cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Agarose. Tais amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12,5%, corado com azul de Coomassie (Figura 1, 2 e 3). Na amostra final, após a expressão das proteínas recombinantes, foi possível observar, em cada gel, a presença de uma banda de maior intensidade em relação ao tempo inicial de expressão na altura de aproximadamente 35 kDa. Tais bandas representam a

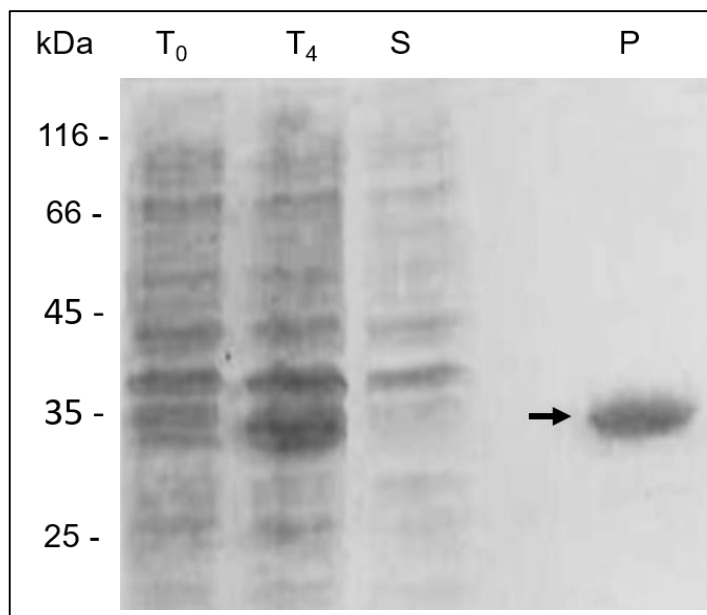
LiRecDT1 (Figura 1), LiRecDT1 H12A (Figura 2) e LgRec1 (Figura 3), todas fusionadas a cauda de 6 histidinas. As proteínas foram expressas em suas formas solúveis, como evidenciado pela análise da fração solúvel obtida após a lise das células. Por fim, após a purificação das toxinas recombinantes, é possível verificar que todas elas foram obtidas com alto grau de pureza. Esses resultados corroboram os obtidos anteriormente e presentes na literatura (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2013).



**FIGURA 1. ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LiRecDT1 EM MEIO LB LÍQUIDO A 30°C UTILIZANDO A CEPA DE EXPRESSÃO *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.** Expressão induzida por 0,05mM de IPTG. A seta representa a banda na altura de aproximadamente 35kDa referente a LiRecDT1. As marcações “T0” e “T3,5” indicam os tempos inicial e final de expressão em horas. É possível verificar o aumento de intensidade da banda em aproximadamente 35 kDa ao comparar “T0” e “T3,5”, evidenciando a expressão da toxina recombinante. As amostras relativas as frações solúveis obtidas após a lise das bactérias estão representadas por “S”, indicando que a proteína esta solúvel. As amostras relativas a proteína purificada após cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Agarose esta representada por “P”.



**FIGURA 2. ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LiRecDT1 H12A EM MEIO LB LÍQUIDO A 30°C UTILIZANDO A CEPA DE EXPRESSÃO *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.** Expressão induzida por 0,05mM de IPTG. A seta representa a banda na altura de aproximadamente 35kDa referente a LiRecDT1 H12A. As marcações “T<sub>0</sub>” e “T<sub>3,5</sub>” indicam os tempos inicial e final de expressão em horas. É possível verificar o aumento de intensidade da banda em aproximadamente 35 kDa ao comparar “T<sub>0</sub>” e “T<sub>3,5</sub>”, evidenciando a expressão da toxina recombinante. As amostras relativas as frações solúveis obtidas após a lise das bactérias estão representadas por “S”, indicando que a proteína esta solúvel. As amostras relativas a proteína purificada após cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Agarose esta representada por “P”.



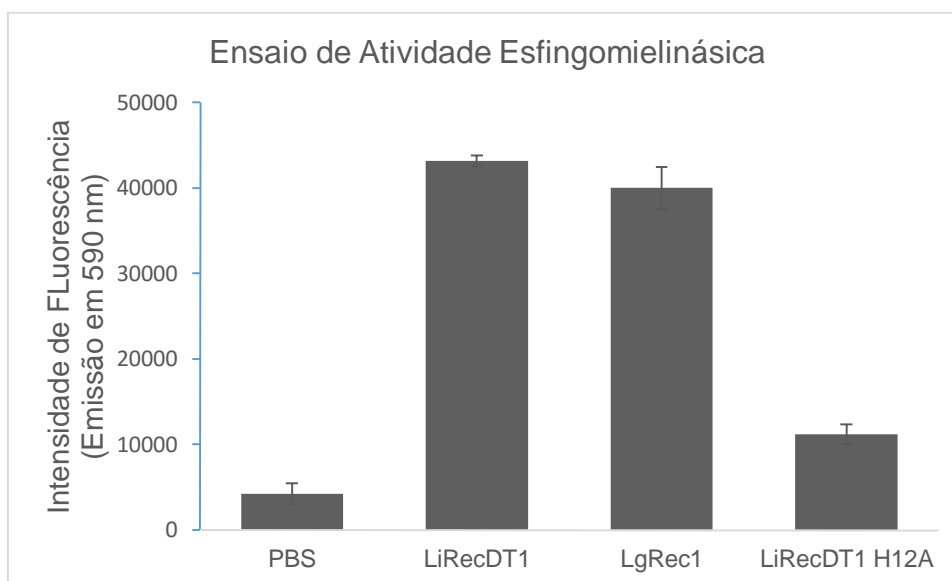
**FIGURA 3. ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LgRec1 EM MEIO LB LÍQUIDO A 37°C UTILIZANDO A CEPA DE EXPRESSÃO *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.** Expressão induzida por 1 mM de IPTG. A seta representa a banda na altura de aproximadamente 35kDa referente a LgRec1. As marcações “T0” e “T4” indicam os tempos inicial e final de expressão em horas. É possível verificar o aumento de intensidade da banda em aproximadamente 35 kDa ao comparar “T0” e “T4”, evidenciando a expressão da toxina recombinante. As amostras relativas as frações solúveis obtidas após a lise das bactérias estão representadas por “S”, indicando que a proteína esta solúvel. As amostras relativas a proteína purificada após cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Agarose esta representada por “P”.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade das fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles* é caracterizada pela hidrólise da ligação fosfodiéster de glicerofosfolípídeos e esfingolípídeos. Dentre os substratos, destacam-se a esfingomielina e o lisofosfatidilcolina, que, quando hidrolisados, há a geração de ceramida-1-fosfato (C1P) e ácido lisofosfatídico (LPA), respectivamente, e liberação de colina (FUTRELL, 1992; LAJOIE *et al.*, 2013; LEE; LYNCH, 2005).

A fim de avaliar a atividade enzimática das toxinas recombinantes, após a expressão da LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LgRec1, elas foram submetidas à avaliação de sua atividade esfingomielinásica. Para isso, utilizou-se o kit para detecção indireta da liberação de colina Amplex Red, como descrito em Materiais e Métodos. Após o ensaio, os dados derivados da leitura espectrofluorimétrica demonstraram que a LiRecDT1 e LgRec1 hidrolisam a esfingomielina, possuindo

atividade quase 4 vezes maior que a isoforma LiRecDT1 H12A (Figura 4). Os dados adquiridos corroboram os resultados obtidos por outros autores (CHAIM *et al.*, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2013; VUITIKA *et al.*, 2013; WILLE *et al.*, 2013). Estes resultados, por sua vez, permitem a utilização para ensaios *in vitro* da LiRecDT1 e LgRec1 como enzimas dermonecróticas ativas, e da LiRecDT H12A como a enzima dermonecrótica com atividade residual.

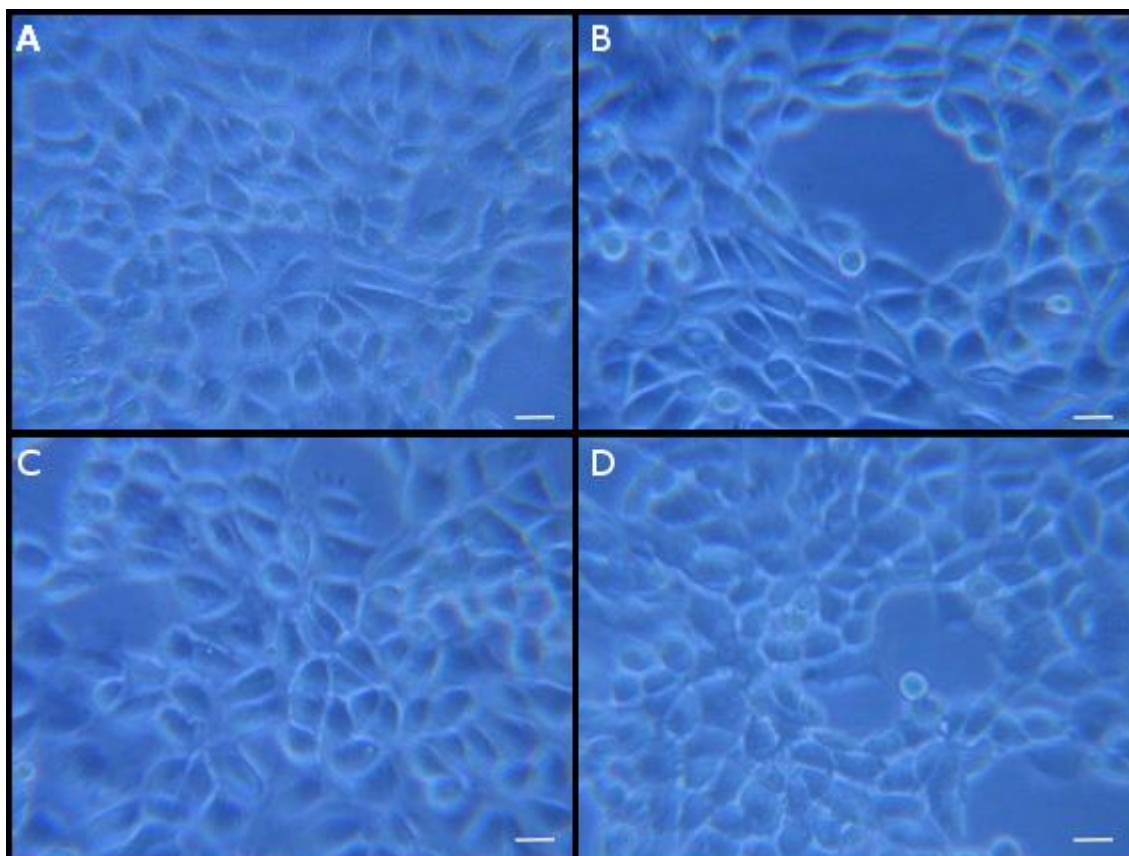


**FIGURA 4. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA ENTRE AS TOXINAS LiRecDT1, LgRec1 e LiRecDT1 H12A.** A Atividade das fosfolipases-D recombinantes purificadas foi avaliada utilizando o kit para detecção indireta da liberação de colina Amplex Red. Os ensaios se deram a 37°C por 1 hora. Como controle de reação foi utilizado PBS na ausência de qualquer toxina. A fluorescência decorrente do produto da reação foi determinada por espectrofluorimetria com excitação em 560nm e emissão em 590nm. Utilizou-se 10µg de cada toxina para o ensaio, em triplicata.

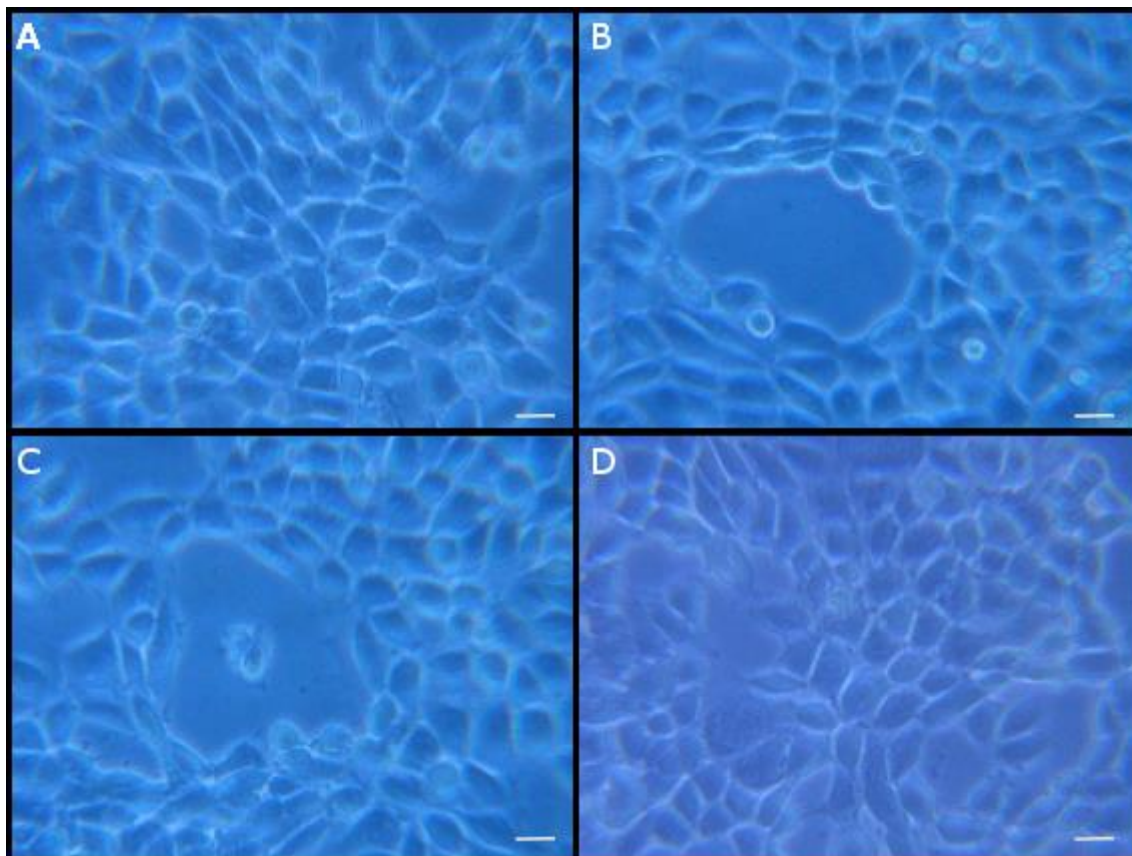
### 5.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1, LiRecDT1H12A E LgRec1 EM LINHAGEM DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO (RAEC) POR MICROSCOPIA DE LUZ

Após se avaliar a atividade esfingomielinásica das toxinas recombinantes, foram avaliadas as alterações morfológicas de células RAEC causadas após a exposição às toxinas LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LgRec1. As observações foram realizadas por microscopia de luz em microscópio invertido. Após a exposição das

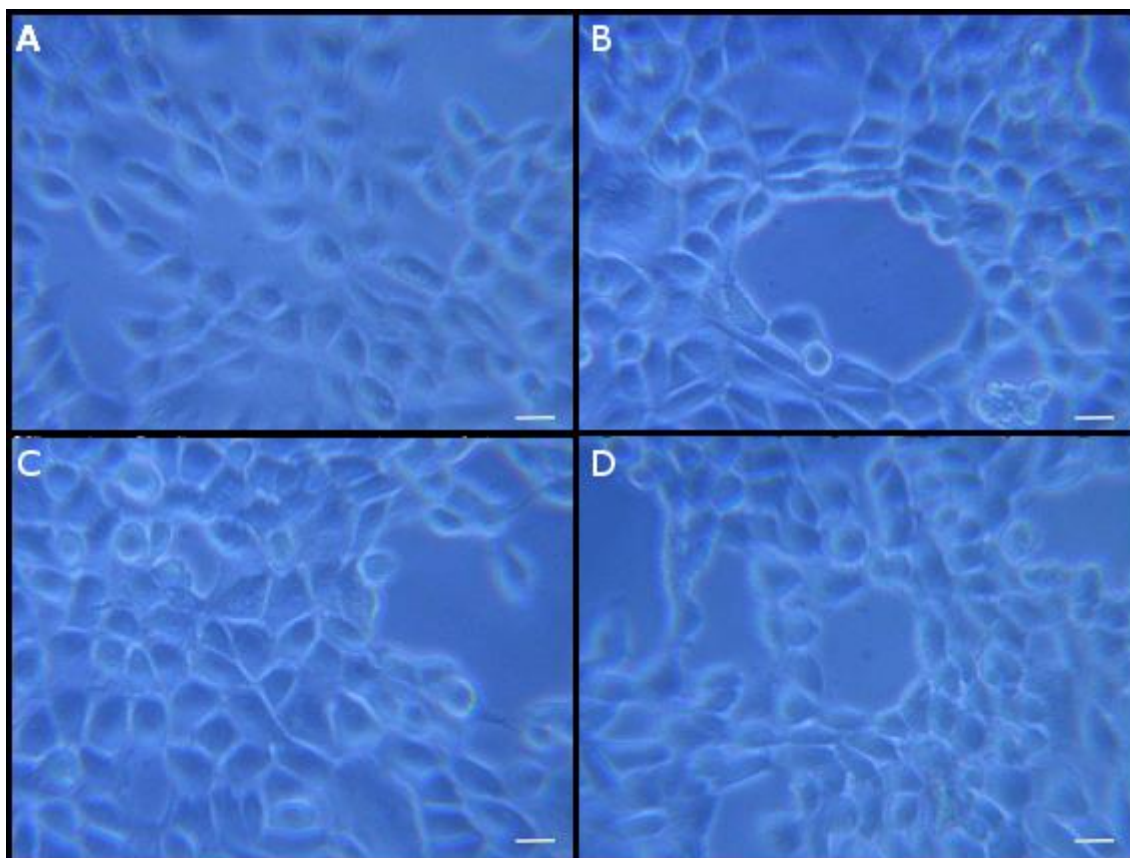
células às toxinas (50 µg/ml), ou PBS, as mesmas foram observadas no tempo inicial de exposição (0h) e nos intervalos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas. Em comparação ao grupo controle (PBS), as células observadas no tempo inicial de exposição e nos tempos 1, 2, 4, e 6 horas após a exposição às toxinas recombinantes não apresentaram alterações morfológicas (Figuras 5 a 9).



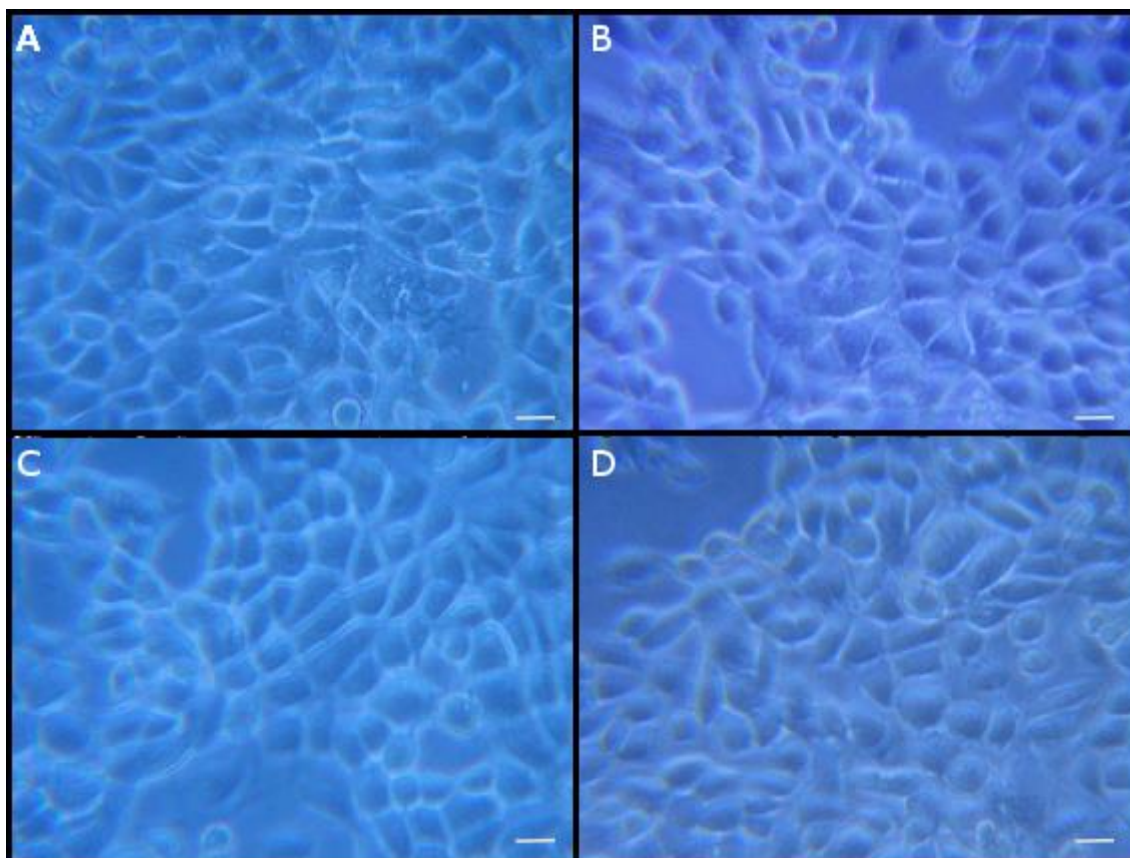
**FIGURA 5. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLOGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 e LgRec1 EM CÉLULAS RAEC NO TEMPO INICIAL.** Células da linhagem RAEC foram expostas à PBS (A), LgRec1 (B), LiRecDT1 (C) e LiRecDT1 H12A (D), e observadas logo após a incubação. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de luz em microscópio invertido. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às toxinas em comparação com as células expostas à PBS. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.



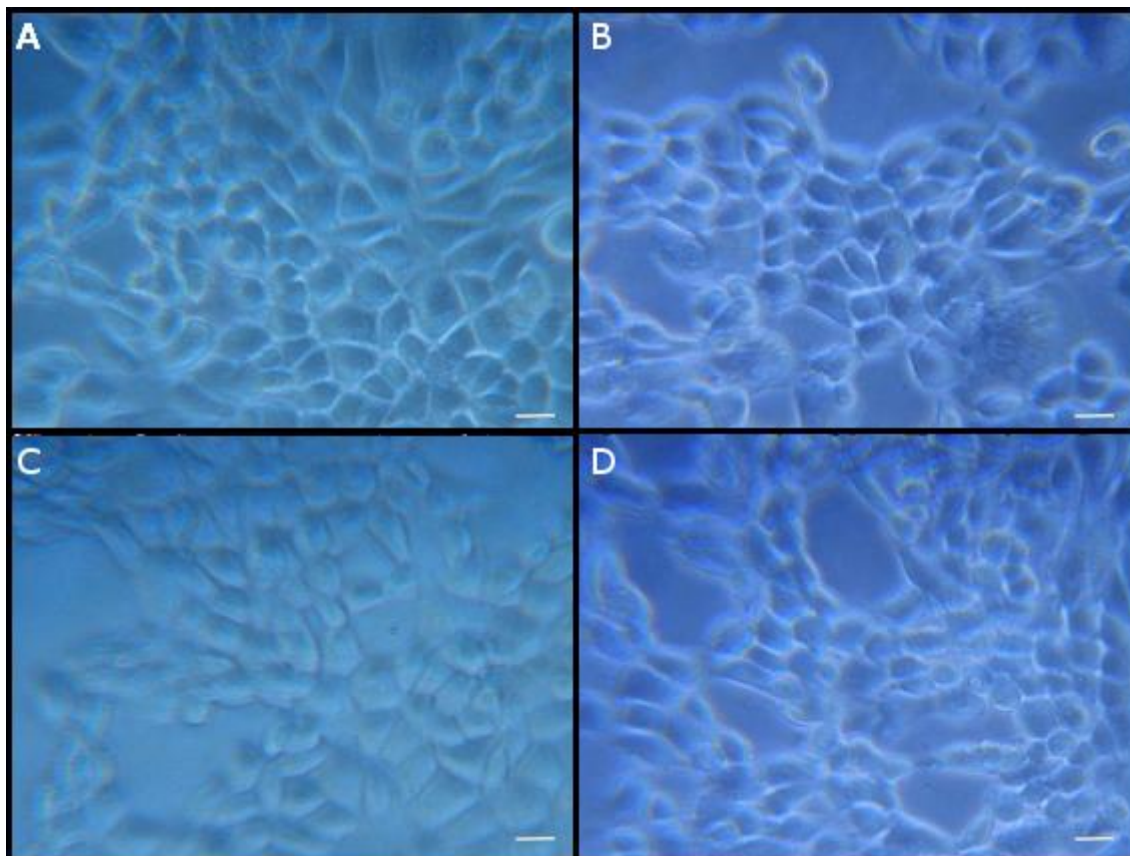
**FIGURA 6. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 e LgRec1 EM CÉLULAS RAEC APÓS UMA HORA DE INCUBAÇÃO.** Células da linhagem RAEC foram expostas à PBS (A), LgRec1 (B), LiRecDT1 (C) e LiRecDT1 H12A (D), e observadas após uma hora de incubação. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às toxinas em comparação com as células expostas à PBS. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.



**FIGURA 7. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 e LgRec1 EM CÉLULAS RAEC APÓS DUAS HORAS DE INCUBAÇÃO.** Células da linhagem RAEC foram expostas à PBS (A), LgRec1 (B), LiRecDT1 (C) e LiRecDT1 H12A (D), e observadas após duas horas de incubação. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às toxinas em comparação com as células expostas à PBS. As barras representam 50µm. Aumento de 520x.

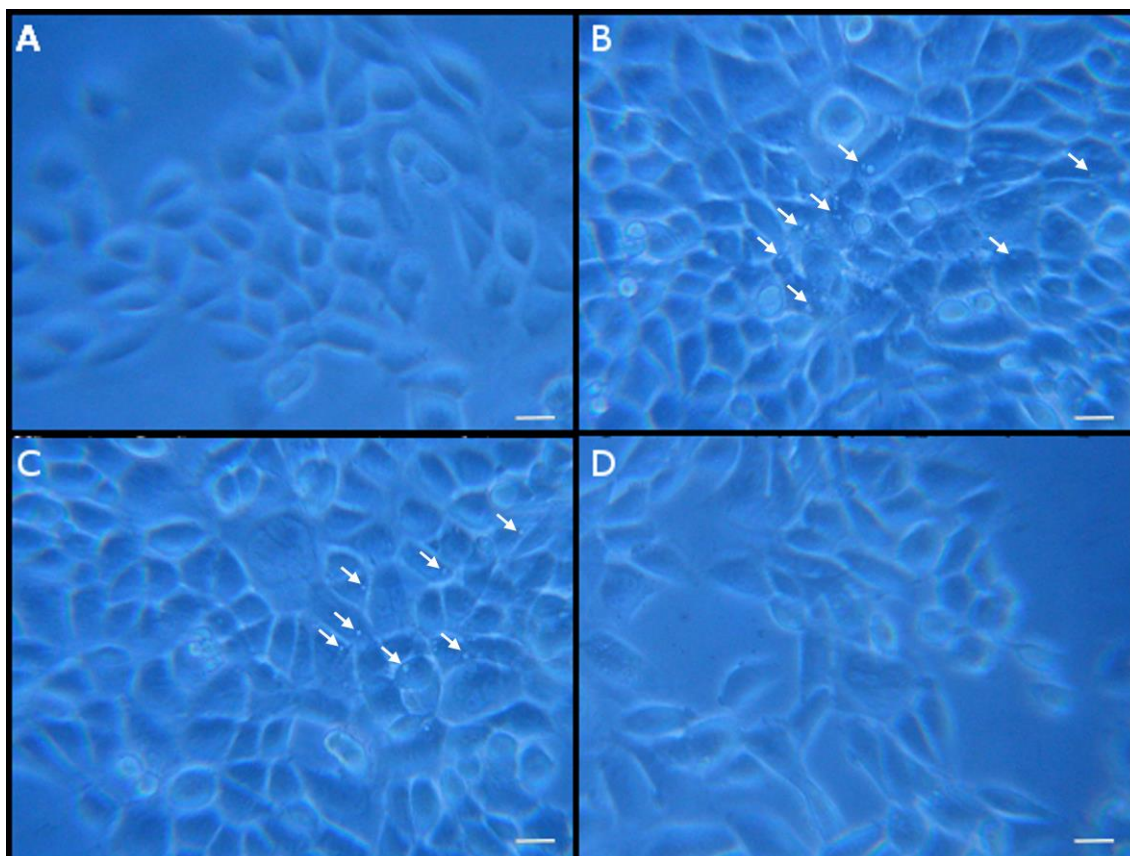


**FIGURA 8. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 e LgRec1 EM CÉLULAS RAEC APÓS QUATRO HORAS DE INCUBAÇÃO.** Células da linhagem RAEC foram expostas à PBS (A), LgRec1 (B), LiRecDT1 (C) e LiRecDT1 H12A (D), e observadas após quatro horas de incubação. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às toxinas em comparação com as células expostas à PBS. As barras representam 50 $\mu$ m. Aumento de 520x.



**FIGURA 9. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 e LgRec1 EM CÉLULAS RAEC APÓS SEIS HORAS DE INCUBAÇÃO.** Células da linhagem RAEC foram expostas à PBS (A), LgRec1 (B), LiRecDT1 (C) e LiRecDT1 H12A (D), e observadas após seis horas de incubação. Não é possível verificar diferenças significativas entre as células expostas às toxinas em comparação com as células expostas à PBS. As barras representam 50 $\mu$ m. Aumento de 520x.

Após 24 horas, ao comparar as células expostas à LiRecDT1 e LgRec1 (Figura 10B e 10C) com o controle negativo incubado com PBS (Figura 10A), foi possível observar a formação de vacúolos citoplasmáticos em algumas células dos cultivos expostos à LiRecDT1 e LgRec1. Contrariamente, a vacuolização não foi observada nas células expostas à LiRecDT1 H12A (Figura 10D).



**FIGURA 10. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LiRecDT1 E LgRec1 EM CÉLULAS RAEC APÓS UM DIA DE INCUBAÇÃO.** Células da linhagem RAEC foram expostas à PBS (A), LgRec1 (B), LiRecDT1 (C) e LiRecDT1 H12A (D), e observadas após vinte e quatro horas de incubação. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de luz em microscópio invertido. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas à LiRecDT1 H12A em comparação com as células expostas à PBS. As células expostas às toxinas LgRec1 e LiRecDT1 apresentaram vacuolização (setas). As barras representam 50 $\mu$ m. Aumento de 520x.

A formação de vacúolos citoplasmáticos já foi descrita anteriormente em células RAEC expostas à LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2011a). Chaim e colaboradores (2011) demonstraram que a vacuolização citoplasmática de células RAEC é seguida de lise celular e perda de adesão à outras células ou à matriz extracelular, de forma tempo-dependente após a exposição do cultivo à LiRecDT1.

#### 5.4 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA BALSAS LIPÍDICAS DE CÉLULAS POR FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE NYCODENZ

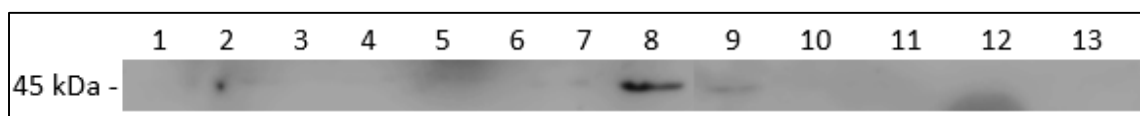
Sabe-se que as fosfolipases-D de *Loxosceles* são capazes de induzir muitos dos sinais e sintomas observados pela ação do veneno total das aranhas. Porém,

pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares de toxicidade destas toxinas (CHAIM *et al.*, 2011a; NOWATZKI *et al.*, 2012). Em 2009, CHAVES-MOREIRA demonstrou que a LiRecDT1 se liga à membrana plasmática e promove a reorganização balsas lipídicas de eritrócitos humanos. Outro estudo demonstrou que toxinas do veneno de *L. intermedia*, interagem com a membrana plasmática de células endoteliais e são internalizadas por elas (NOWATZKI *et al.*, 2010).

Nesse contexto, buscamos identificar uma possível interação das fosfolipases recombinantes com microdomínios de balsas lipídicas de células endoteliais. A partir da padronização do fracionamento de membrana plasmática de células RAEC, procuramos identificar em quais frações se concentravam os microdomínios de balsas lipídicas. A purificação destes microdomínios baseia-se em sua insolubilidade em Triton X-100 1% a 4°C e em suas diferentes densidades (SOUZA, 2012). Segundo Souza (2012), as frações de balsas lipídicas possuem baixa densidade e, por isso, costumam se acumular no topo do gradiente de Nycodenz, quando purificadas desta forma, em relação ao restante do conteúdo citoplasmático e às porções de membrana solúveis em Triton X-100 1%.

Após a lise e ultracentrifugação das células, foram coletadas 13 frações de 180 µL do topo ao fundo do tubo. Amostras de cada uma das frações foram analisadas por *Western blotting*, utilizando-se o anticorpo anti-flotilina, o qual foi empregado como marcador de balsas lipídicas.

Como resultado, pudemos observar que as frações 8 e 9 apresentaram maior concentração de flotilina (FIGURA 11), sugerindo que as balsas lipídicas estão purificadas e presentes nas mesmas, em especial na primeira.

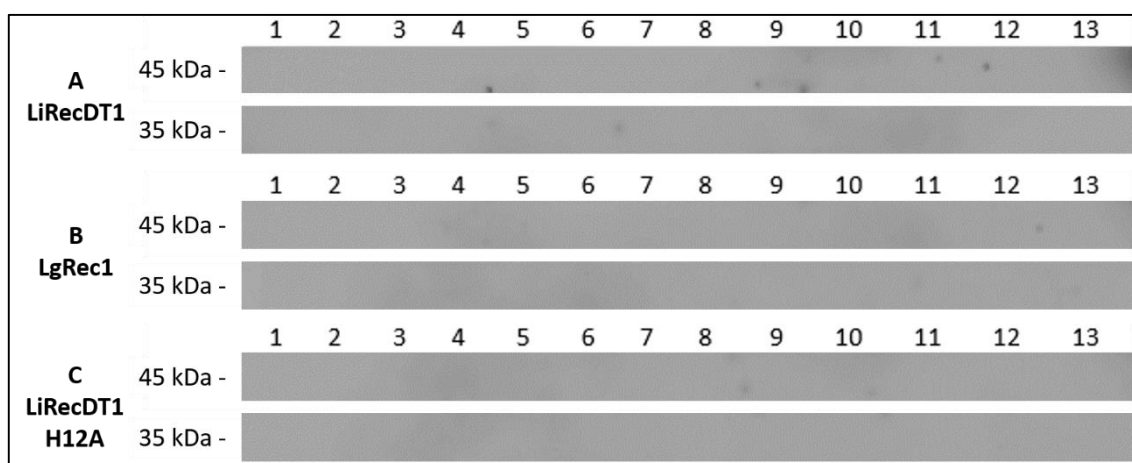


**FIGURA 11. ISOLAMENTO DE BALSAS LIPÍDICAS.** As balsas lipídicas foram purificadas a partir de células RAEC. Treze frações de 180 µL foram coletadas da amostra submetida à ultracentrifugação. Após a dosagem proteica dessas frações por micro BCA, 1µg de massa proteica de cada uma das frações foi separada em SDS-PAGE 12,5% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Utilizando-se um anticorpo anti-flotilina-1, evidenciou-se a presença de flotilina-1 (47 kDa), proteína presente em balsas lipídicas, nas frações 8 e 9. Sugere-se a concentração de balsas lipídicas nestas duas frações, em especial na oitava.

Após padronizar o protocolo, o passo seguinte foi realizar o fracionamento de células RAEC expostas às diferentes toxinas recombinantes: LgRec1, LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. O objetivo deste ensaio foi identificar se as toxinas se concentrariam

em alguma fração específica de membrana, em especial aquelas que contém balsas lipídicas.

Primeiramente obtivemos como resultado a não detecção das toxinas recombinantes em nenhuma das frações. A hipótese levantada foi que, devido à possíveis interações fracas com a superfície celular, as toxinas não se ligaram com intensidade suficiente nestas regiões para continuarem presentes nelas após o fracionamento. Como alternativa, optou-se pelo uso de formaldeído 2% para a fixação do cultivo após a adição das toxinas e antes do desprendimento pela ação da viocase. Porém, com este protocolo, encontramos dificuldade no desprendimento das células, provavelmente devido à fixação com formaldeído. Por fim, a ausência de frações contendo balsas lipídicas ou toxinas no resultado de *Western blotting* (figura 12) demonstra necessidade de padronização e aperfeiçoamento do método. Uma vez que se modificou o protocolo original de fracionamento com a adição da etapa de fixação, é interessante trabalhar em uma nova padronização do ensaio original de purificação das balsas lipídicas. Outro ponto a se considerar para o aprimoramento do método é o aumento da massa de toxina a qual as células foram expostas: é possível que com uma quantidade inicial maior de toxinas, mesmo com a perda durante o fracionamento, ainda seja possível visualiza-las em algumas das frações.



**FIGURA 12. ISOLAMENTO DE BALSAS LIPÍDICAS E TOXINAS RECOMBINANTES.** As balsas lipídicas foram purificadas a partir de células RAEC tratadas com LiRecDT1 (A), LgRec1 (B) ou LiRecDT1 H12A (C) na concentração de 50 µg/ml. Treze frações de 180 µL foram coletadas da amostra submetida à ultracentrifugação. Após a dosagem proteica dessas frações por micro BCA, 1 µg de massa proteica de cada uma das frações foi separada em SDS-PAGE 12,5% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Utilizando-se um anticorpo anti-flotilina-1 se buscou a presença de flotilina-1 (47 kDa), enquanto a presença de toxinas recombinantes (aproximadamente 35 kDa) foi avaliada através do uso de um soro policlonal anti-fosfolipases-recombinantes. Não foi identificada a presença de balsas lipídicas ou toxinas recombinantes em nenhum dos três tratamentos.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi possível realizar a expressão de LiRecDT1, LgRec1 e LiRecDT1 H12A em cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. As toxinas recombinantes foram obtidas em suas formas solúveis e com alto grau de pureza, o que possibilitou a realização de ensaios *in vitro*.

Na avaliação da atividade esfingomielinásica, LgRec1 e LiRecDT1 mostraram alta atividade enzimática em comparação à LiRecDT1 H12A, que apresentou atividade residual.

Tendo em vista avaliar os efeitos citotóxicos das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), estas foram expostas às toxinas durante diferentes intervalos de tempo. Análises morfológicas obtidas por microscopia de luz em microscópio invertido revelaram que após 24 horas de exposição às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1, algumas células apresentaram vacuolização citoplasmática. Foi a primeira vez esse fenômeno foi observado associado à ação da LgRec1.

A purificação de balsas lipídicas de células RAEC através do fracionamento de membrana se mostrou eficiente para a identificação e separação destes microdomínios. Porém, para que seja possível a análise de presumíveis interações de balsas lipídicas com as toxinas recombinantes, ainda é necessário a padronização da exposição do cultivo às toxinas e consequente fracionamento e purificação, uma vez que isso não foi possível neste trabalho. A obtenção destes dados permitirá uma melhor compreensão de mecanismos moleculares que sustentam o papel citotóxico das fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles* no loxoscelismo. Além disso, essas e outras informações derivadas podem contribuir para o tratamento do envenenamento, desenvolvimento de novos fármacos e melhor compreensão de diferentes eventos biológicos.

## REFERÊNCIAS

ALBINET, V. *et al.* Sphingolipids: Basic Science and Drug Development. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 215, p. 127–52, 2013.

ANLIKER, B.; CHUN, J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20555–20558, 2004.

AOKI, J. *et al.* Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 50, p. 48737–44, 13 dez. 2002.

APPEL, M. H. *et al.* Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 2, p. 167–178, 2008.

BICKEL, P. E. *et al.* Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13793- 13802, 1997.

BRONDYK, W. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. **Methods in enzymology**, v. 463, n. 09, p. 131–47, 2009.

BUSSE, R.; FLEMING, I. Vascular endothelium and blood flow. **The Vascular endothelium II**, n. 176, p. 43–78, 2006.

CHAIM, O. M. *et al.* Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 1, p. 64–77, 2006.

CHAIM, O. M. *et al.* Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1811, n. 2, p. 84–96, mar. 2011a.

CHAIM, O. M. *et al.* Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins**, v. 3, n. 3, p. 309–44, 22 mar. 2011b.

CHALFANT, C. E.; SPIEGEL, S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 20, p. 4605–4612, 2005.

CHATZAKI, M. *et al.* Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 21–30, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2529–2540, 2011.

DA SILVA, P. H. *et al.* Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 1 dez. 2004.

DA SILVEIRA, R. B. *et al.* Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 815–822, 2002.

DA SILVEIRA, R. B. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241–1253, 2006.

DA SILVEIRA, R. B. *et al.* Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 758–768, 2007a.

DA SILVEIRA, R. B. *et al.* Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289–300, 2007b.

DRAGULEV, B. *et al.* Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1264–1266, 2007.

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, 2013.

FISCHER, M. L. **Descrição do comportamento agonístico de *Loxosceles laeta*, *L. hirsuta* e *L. intermedia* (Araneae: Sicariidae)** Revista Brasileira de Zoologia, 2008.

FISCHER, M. L.; BAZILIO, S.; SANTOS, T. V. B. DOS. Diagnóstico da ocorrência de aranhas do gênero *Loxosceles* Heineken e Lowe, 1832 (Araneae, Sicariidae) no município de União da Vitória, Paraná. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 155–159, 2009.

FOURCADE, O. *et al.* Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. **Cell**, v. 80, n. 6, p. 919–927, 24 mar. 1995.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications: sixth edition. In: **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. [s.l: s.n.]. p. 317–334.

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

GOMEZ-CAMBRONERO, J. New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 1356–1369, 2010.

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 : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 83, p. 91–120, jun. 2014.

HENRY, B. *et al.* Targeting the ceramide system in cancer. **Cancer letters**, v. 332, n. 2, p. 286–94, 28 maio 2013.

HERREROS, J.; NG, T.; SCHIAVO, G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 10, p. 2947–2960, 2001.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **The Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039–2047, dez. 2011.

KIRKHAM, M.; PARTON, R. G. Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1746, n. 3, p. 350–363, dez. 2005.

KOVBASNJUK, O.; EDIDIN, M.; DONOWITZ, M. Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 22, p. 4025–4031, 2001.

KUSMA, J. *et al.* Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v.90, p. 1722–1736, 2008.

LAJOIE, D. M. *et al.* Phospholipase D Toxins of Brown Spider Venom Convert Lysophosphatidylcholine and Sphingomyelin to Cyclic Phosphates. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

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

LEY, K.; REUTERSHAN, J. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 176, n. PART2, p. 97–133, 2006.

MAGALHÃES, G. S. *et al.* Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1773–1783, 2013.

MÁLAQUE, C. M. S. A. *et al.* Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139–143, 2002.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. Distribuição das espécies do genero *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 331–335, 2005.

MCDERMOTT, M.; WAKELAM, M. J. O.; MORRIS, A. J. Phospholipase D. **Biochimie et biologie cellulaire**, v. 82, n. 1, p. 225–53, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; DATASUS. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>>.

MINSHALL, R. D.; MALIK, A. B. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 176 Pt 1, p. 107–44, 2006.

MUNRO, S. Lipid Rafts. **Cell**, v. 115, n. 4, p. 377–388, nov. 2003.

NOWATZKI, J. *et al.* Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 4, p. 535–43, 15 set. 2010.

NOWATZKI, J. *et al.* Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 3, p. 396–405, 1 set. 2012.

PALUDO, K. S. *et al.* The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 844–853, jun. 2006.

PETTUS, B. J. *et al.* Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p. 38206–38213, 2003.

PLATNICK, N. I. **The world spider catalog, version 14.0**. American Museum of Natural History.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803–815, 2007.

RIBEIRO, R. O. S. *et al.* Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162–1174, 2007.

RÖMER, W. *et al.* Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 670–675, 2007.

ROTH, M. G. Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. **Traffic**, v. 9, n. 8, p. 1233–1239, 2008.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, n. 1-2, p. 249–264, 2008.

SANO, T. *et al.* Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21197–206, 14 jun. 2002.

SCHROEDER, F. C. *et al.* NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 38, p. 14283–7, 23 set. 2008.

SENEFF-RIBEIRO, A. *et al.* Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 3, p. 210–8, jan. 2008.

SOUZA, L. E. R. DE. Caracterização da interação entre a Rho GTPase de baixa massa molecular Rnd1 e a proteína STI1: possíveis implicações biológicas no desenvolvimento do sistema nervoso. Caracterização da interação entre a Rho GTPase de baix. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, 2012.

STODDARD, N. C.; CHUN, J. Promising Pharmacological Directions in the World of Lysophosphatidic Acid Signaling. v. 23, n. 1, p. 1–11, 2015.

TAMBOURGI, D. V; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 7, p. 1113–9, 15 dez. 2010.

TORGERSEN, M. L. *et al.* Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 20, p. 3737–3747, 2001.

VAN DIJK, M. C. *et al.* Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways. **Current biology : CB**, v. 8, n. 7, p. 386–392, 1998.

VEIGA, S. S. *et al.* Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochemical Journal**, v. 32, n. 7, p. 397–408, 2000a.

VEIGA, S. S. *et al.* Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 825–839, jun. 2000b.

VETTER, R. S. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. **Journal of Arachnology**, v. 36, n. 1, p. 150–163, 2008.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 391–400, fev. 2001.

YUNG, Y. C.; STODDARD, N. C.; CHUN, J. **LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology**. [s.l: s.n.]. v. 55