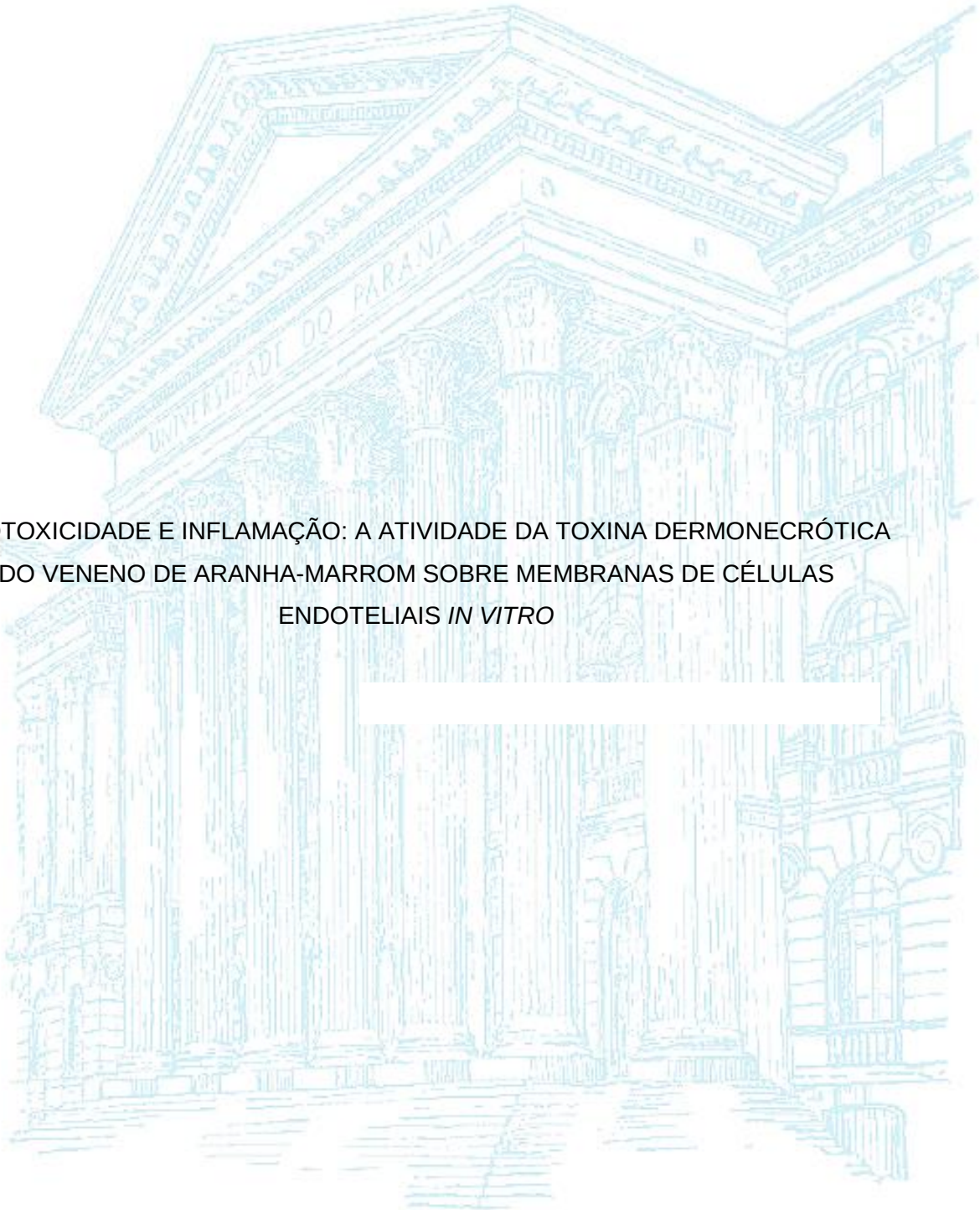
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO MARCELO MORGON



CITOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO: A ATIVIDADE DA TOXINA DERMONECRÓTICA DO VENENO DE ARANHA-MARROM SOBRE MEMBRANAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS *IN VITRO*

CURITIBA
2017

ADRIANO MARCELO MORGON

CITOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO: A ATIVIDADE DA TOXINA DERMONECRÓTICA DO VENENO DE ARANHA-MARROM SOBRE MEMBRANAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS *IN VITRO*

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª. Drª. Olga Meiri Chaim

Co-Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Ingresso: Março de 2013
Previsão de Defesa: Fevereiro de 2017

CURITIBA
2017

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR
Aprovado

Profa. Dra. Daniela Fiori Gradia
Universidade Federal do Paraná - UFPR
Aprovado

Profa. Dra. Daniela Parada Pavoni
Instituto Carlos Chagas - ICC
Aprovado

Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná (UFPR)
aprovado

Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho
Universidade Federal do Paraná - UFPR
Aprovado

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o candidato ***Adriano Marcelo Morgon***, em relação ao seu trabalho intitulado: "Citotoxidade e inflamação: a atividade da toxina dermonecrótica do veneno de aranha-marrom sobre membranas de células endoteliais in vitro", são de parecer favorável à APROVAÇÃO do acadêmico, habilitando-o ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.
A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 01 de Fevereiro de 2017

Profª Drª Andrea Senff Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 200261

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a minha orientadora Profª Drª Olga Meiri Chaim por todo o tempo investido em minha formação, desde o início do Mestrado até o final do Doutorado, sempre acreditando em meu potencial, e sendo um grande exemplo de ética e profissionalismo na ciência, bem como um grande exemplo de orientadora, sempre dando suporte aos alunos com muita dedicação e esforço, o que é raríssimo no meio acadêmico. Nunca irei esquecer todos os seus ensinamentos, pois tudo que aprendi nesta fase, foi decorrente do seu excelente trabalho.

Agradeço também aos professores Dr. Silvio Sanches Veiga e Drª Andrea Senff Ribeiro pelas discussões científicas e apoio durante a minha jornada acadêmica, sempre ajudando quando possível, financeiramente e intelectualmente, e contribuindo com ideias e críticas construtivas para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a Profª Drª Luiza Gremski, que também sempre esteve disposta a ajudar, com muita paciência e serenidade, indicando os melhores caminhos a serem tomados nos momentos de desenvolvimento dos experimentos, além de ser um grande exemplo a ser seguido como profissional da área científica.

Agradeço as secretárias da pós-graduação Marlene e Mirian, por todo o apoio com a papelada e burocracias necessárias durante o Doutorado, estando sempre dispostas à ajudar em todos os momentos.

Agradeço ao segurança da portaria do prédio de Biológicas, Luis, que sempre dava o primeiro bom-dia que eu recebia quando entrava no prédio, com muita educação e bom-humor.

Agradeço aos amigos do laboratório Larissa Vuitika, Aline Viana, Fernando Matsubara, , Marianna Bóia, Daniele Chaves, e Valéria Ferrer, que estiveram sempre presentes ao longo deste período, dentro e fora do ambiente de trabalho, me incentivando e dando vários conselhos sobre como proceder na jornada acadêmica, além de serem grandes parceiros de discussões científicas e sobre a vida.

Gostaria de agradecer a Dilza Trevisan, “irmã-metalo”, que contribuiu com muitos ensinamentos sobre profissionalismo, ética e diversas discussões científicas deste o meu início no laboratório. Agradeço muito pela sua amizade e pelos conselhos dados. Agradeço também pelos momentos de descontração, corridas de kart, e conselhos sobre a vida.

Gostaria de agradecer aos alunos de iniciação científica do laboratório, Hanna da Justa, Fernando Jacomini, Priscila Vieira, Alana Basílio, Diogo de Lima, Eduardo Soares, Greicy Tonet, e as novas Doutorandas Thaís Pereira, Zelinda Schemazssen, por terem me dado a oportunidade de contribuir com algumas ideias, mas principalmente, por me ensinarem e me lembrarem a cada dia que toda jornada tem um início, e que sempre há muito o que aprender, independente do quanto eu já estudei e do quão longe eu já caminhei.

Gostaria de agradecer especialmente à Profª Drª Helena Nader e ao Prof. Dr. Marcelo Lima por abrir o seu laboratório na UNIFESP e me permitir desenvolver as atividades relacionadas a este projeto, além das discussões científicas e ideias que contribuiram grandemente para a conclusão desta tese. Agradeço também ao Dr. Gustavo Viana e ao Dr. Renan Cavalheiro, por terem estado ao meu lado e me ensinado muito sobre a várias técnicas de microscopia, além das ideias e contribuições para o trabalho, e pelos momentos de descontração no laboratório e fora dele. Agradeço a Doutoranda Maria Cecília "Ciça", que me auxiliou muito durante as primeiras viagens para São Paulo, e participou ativamente de todas as discussões científicas relacionadas ao projeto, sendo sempre atenciosa e paciente. Enfim, aos amigos do INFAR, vocês são simplesmente fantásticos e so muito grato pela amizade que tenho com todos vocês.

Agradeço especialmente aos meus grandes amigos e praticamente irmãos Gustavo Rossi, Thiago de Mari, Thiago Batista, Gabriel Leão, Gabriel Meissner e Bruno Antunes. Sem dúvida estes caras são grandes exemplos de pessoa e profissionais a ser seguidos. Agradeço a vocês pela nossa amizade, e pelos momentos de discussão científica, aprendizado, e também de descontração nas corridas de kart, jogos de futebol e conselhos sobre a vida. Vocês são pessoas fenomenais.

Agradeço especialmente a mestranda Antonielle Baldisera e a Doutoranda Elidiana de Bona, por ter sempre me incentivado e estado ao meu lado, principalmente nesta fase final do Doutorado, e pela amizade que possuimos. Sem dúvidas aprendi e aprendo muito com vocês, pessoalmente e profissionalmente, e espero poder sempre contribuir no que eu puder.

Agradeço especialmente a doutoranda Vanessa Ribeiro, a qual esteve sempre presente nas discussões sobre este projeto, além de me incentivar em todos os momentos, e de ter me dado a oportunidade de transmitir alguns ensinamentos sobre técnicas e experimentos do laboratório. Acimda de tudo, agradeço pela amizade que construímos no curto período de tempo que nos conhecemos, e sem dúvida, aprendi e ainda aprendo muito sobre ciência e sobre a vida com você. Espero poder contribuir para o seu desenvolvimento como pessoa e profissional assim como você contribuiu para o meu.

Gostaria de agradecer especialmente a três alunos de iniciação científica que estiveram presentes durante o meu Doutorado, sendo meus co-orientados durante os seus trabalhos. Aprendi muito com os alunos Alysson Urbanski, Brenda Marin e, recentemente, Paula Deboni. Esse trio jamais será esquecido, pois sempre me ajudaram no laboratório e sempre estiveram dispostos a me ouvir e seguir os meus ensinamentos. Posso ter sido chato e exigente, mas esses três não desistiram de estar ao meu lado e, hoje, com muito orgulho, digo que foi um prazer estar ao lado deles também e possuir a amizade temos.

Agradeço especialmente a minha irmã Christiane Zanetti, que sempre me apoiou durante a minha vida toda, estando sempre ao meu lado, e sendo um

exemplo de pessoa a ser seguido, pois sua determinação e esforço sempre foram qualidades que eu observei e procurei aplicar em tudo o que fiz e faço.

Agradeço especialmente aos meus pais, José Marcelo Morgon e Ivone Simões Morgon, que me deram a vida e me guiaram por todo o meu caminho e me ensinaram tudo que sei sobre a vida. Agradeço principalmente à minha mãe, que sempre foi uma guerreira e é o meu grande exemplo de bondade a ser seguido. Sem ela, eu não seria absolutamente nada do que sou hoje. Dedico toda a minha jornada acadêmica a você, mãe.

Gostaria especialmente e principalmente de agradecer a minha noiva, amiga e eterna companheira Eleonora Paulini, a qual foi a minha inspiração para todas as minhas atividades desde que a conheci. Sempre estando ao meu lado, acreditando no meu progresso, e confiando na minha capacidade de tomada de decisões profissionais e pessoais, sem dúvida ela é a grande mulher que me dá forças para seguir adiante. Sem você, meu amor, eu não seria o homem que sou.

PRÓLOGO

O intuito deste prólogo consiste em descrever, resumidamente, o histórico de pesquisa desenvolvido durante o período do Doutorado, o qual resulta na produção desta tese, e também demonstrar as estratégias utilizadas durante os dois primeiros anos do curso envolvendo o projeto anterior a este, a partir do qual, por limitações técnicas, buscou-se a alteração do projeto de pesquisa, como detalhado abaixo.

Durante os dois primeiros anos de doutorado, com o projeto intitulado "Clonagem, expressão heteróloga e análise estrutural e funcional de uma metaloprotease do tipo astacina presente no veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)" foi possível realizar a clonagem e expressão da metaloprotease do tipo astacina LALP3 do veneno de *L. intermedia.* Este projeto consistiu na utilização de dois sistemas para a expressão heteróloga da toxina recombinante: cepas bacterianas *E. coli* BL21 (DE3) STAR e *E. coli* Shuffle T7 Express LysY, e cepas de levedura *P. pastoris* X-33, KM71H e SMD1168H.

Em resumo, foi possível expressar a LALP3 na condição solúvel, porém, sem atividade biológica, nas cepas bacterianas, de modo que foi possível a publicação em primeira autoria do manuscrito com título: "Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom" no ano de 2016. No entanto, após extensivas tentativas de expressão da LALP3 nas três cepas de *P. pastoris,* após a avaliação da presença do cassete de expressão referente à LALP3 no genoma da levedura e posterior análise da presença do mRNA referente à toxina após a expressão, concluiu-se que sob todas as condições testadas, não foi possível obter a toxina recombinante por limitações oriundas do próprio sistema de expressão utilizado. A tabela presente no Anexo I resume as estratégias de expressão utilizadas para a obtenção da LALP3 em ambos os sistemas supracitados.

Desta forma, após discussão com os avaliadores do projeto até então, Prof. Dr. Nilson Zanchin e Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso, durante a segunda avaliação anual no Evento dos Doutorandos de 2014, realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR, sugeriu-se alteração de projeto de pesquisa, devido às dificuldades técnicas que limitaram

o prosseguimento do projeto. Assim, durante o terceiro ano do doutorado (2015), foi proposto o desenvolvimento do projeto com título “Citotoxicidade e inflamação: a atividade da toxina dermonecrótica do veneno de aranha-marrom sobre membranas de células endoteliais *in vitro.”*, sendo que ele teve seu início imediato após aprovação pelo colegiado do referido programa de pós-graduação. Durante o terceiro ano de doutorado, portanto, foi possível realizar a escrita do novo projeto de doutorado, a expressão da fosfolipase-D recombinante do veneno de *L. intermedia* (LiRecDT1) e sua respectiva isoforma com mutação sítio-dirigida (LiRecDT1/H12A) com atividade enzimática residual, e padronizar as condições para avaliar as possíveis alterações morfológicas decorrentes de sua atividade sobre células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC). Ainda, foi possível obter dados que indicavam a interação da toxina recombinante com a membrana destas células e possivelmente seu endereçamento para o sistema endossomo/lisossomo por meio de técnicas de microscopia, dados estes que foram refinados e confirmados durante o ano de 2016.

Além disso, ainda em 2015, em um projeto paralelo desenvolvido com as fosfolipases-D de *L. intermedia* e outras toxinas, no qual foi analisado o potencial imunogênico e reatividade cruzada de diversas toxinas recombinantes do veneno de *L. intermedia* com soros produzidos com venenos de aranhas das espécies *L. laeta* e *L. gaucho,* foi possível publicar em co-autoria o manuscrito com título: “Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity”.

RESUMO

As fosfolipases de aranhas do gênero *Loxosceles*, também conhecidas como toxinas dermonecróticas, são as toxinas do veneno melhor caracterizadas do ponto de vista bioquímica e biológica e estão relacionadas a diversos eventos, como hemólise, coagulação intravascular disseminada, edema e indução de resposta inflamatória. Os principais substratos lipídicos para estas toxinas são a esfingomielina e lisofosfatidilcolina que, após sua hidrólise, geram como produtos a ceramida-1-fosfato e o ácido lisofosfatídico, respectivamente, lipídeos bioativos que estão envolvidos em diversos processos celulares, incluindo a modulação da resposta inflamatória. A toxina LiRecDT1, a primeira isoforma de fosfolipase recombinante de *L. intermedia* caracterizada, além de promover o recrutamento de neutrófilos em pele de coelho, se liga à membrana de células endoteliais de aorta de coelho, promovem alterações morfológicas e induzem a reorganização de microdomínios de membrana caracterizados por *lipid rafts*, porém, os mecanismos envolvidos neste processo ainda permanecem desconhecidos. Desta forma, os objetivos deste trabalho compreenderam a análise dos mecanismos moleculares da ação do veneno e da LiRecDT1 após a interação com a membrana de células endoteliais, visando determinar as alterações morfológicas das células, alterações bioquímicas da membrana plasmática, e a possível internalização da toxina recombinante. Primeiramente, as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A (isoforma mutada com atividade residual) foram expressas em cepa de *E. coli* e então avaliadas em relação à sua atividade esfingomielinásica, de modo que as toxinas foram obtidas com alto grau de pureza e tanto o veneno como a LiRecDT1 apresentaram atividade esfingomielinásica, sendo que a LiRecDT1/H12A apresentou atividade residual. Em seguida, foi verificado que o veneno promove a desadesão de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) e que a LiRecDT1 promove a vacuolização citoplasmática e alteração na morfologia celular após 2 horas de incubação com a toxina, sendo que este evento é observado até 24 horas. Ainda, a interação da LiRecDT1 com a membrana plasmática destas células foi avaliada por microscopia de fluorescência confocal, TIRF, e de super-resolução, onde foi possível visualizar que a LiRecDT1 se liga à membrana das células e promove a reorganização de *lipid rafts* após 1 hora, e se liga à caveolina-1 presente nestes domínios de maneira tempo-dependente. Ainda, os dados da microscopia de super-resolução sugeriram a possível endocitose da LiRecDT1, o que foi comprovado pela co-localização com proteínas do sistema endossomo/lisossomo após 1 e 4 horas, por microscopia confocal. Sendo assim, fica evidente que a toxina interage com a membrana plasmática de células endoteliais, especificamente com microdomínios de *lipid rafts*, e é internalizada e endereçada para compartimentos do sistema endossomo/lisossomo. Contudo, novos estudos devem ser realizados a fim de caracterizar possíveis parceiros moleculares para a LiRecDT1, assim como investigar vias de sinalização ativadas/inativadas decorrentes da reorganização dos microdomínios de membrana. Além disso, é discutida a possibilidade de a LiRecDT1 estar sendo enviada para a membrana ou até mesmo ser exocitada após a sua internalização, de modo que outros destinos intracelulares para a toxina recombinante podem ser exploradas.

Palavras-chace: Fosfolipases-D, *L. intermedia*, *lipid rafts*, endocitose

ABSTRACT

Phospholipases from Loxosceles spiders, also known as dermonecrotic toxins, are the best-characterized toxins in the venom regarding their biochemical and biological activities, and they are related to several events such as hemolysis, disseminated intravascular coagulation, edema, and induction of inflammatory responses. Their main lipid substrates are sphingomyelin and lysophosphatidylcholine, that, agter hydrolysis, generate ceramide-1-phosphate and lysophosphatidic acid as subproducts, respectively, which are bioactive lipids involved in cellular processes including the modulation of inflammatory responses. The toxin LiRecDT1, the first characterized recombinant phospholipase isoform from *L. intermedia*, besides recruiting neutrophils in rabbit skin, binds rabbit aorta endothelial cells membrane, and induce lipid raft reorganization, however, the mechanisms that drive such process remain unknown. Thus, the objectives os this work regarded the analysis of the molecular mechanisms of action of the venom and LiRecDT1 after interaction with endothelial cell membrane, aiming to determine the cell morphological alterations, plasma membrane biochemical alterations, and the possible internalization of the recombinant toxin. First, the toxins LiRecDT1 and LiRecDT1/H12A (mutated isoform with residual activity) were expressed in an *E. coli* strain and then evaluated in relation to their sphingomyelinase activity. The toxins were obtained with high putiry levels and the venom and LiRecDT1 showed sphingomyelinase activity, and LiRecDT1/H12A showed only residual activity. After, it was shown that the venom promotes rabbit aorta endothelial cell (RAEC) detachment, and that LiRecDT1 induces cell vacuolization and cell morphology alteration after two hours incubation with the toxin, event still observed after 24 hours. Moreover, the interaction of LiRecDT1 with the plasma membrane of these cells was evaluated by confocal fluorescence microscopy, TIRF, and super-resolution microscopy, where it was observed that LiRecDT1 binds the cell membrane and promote lipid raft reorganization after 1 hour, and binds caveolin-1 present in these domains in a time-dependent manner. Data from the super-resolution microscopy suggested the possible LiRecDT1 endocytosis, which was proved to be true after the co-localization with proteins present in endosome/lysosome compartments after 1 and 4 hours, by confocal microscopy. Thus, its evident that the toxin interacts with endothelial cell plasma membrane , especifically with lipid rafts, and is internalized and sent to endosomal/lysosomal compartments. However, more studies must be taken in order to characterize possible molecular partners for LiRecDT1, as well as investigate signaling pathways modulated by the reorganization of lipid rafts. Besides, the possibility of LiRecDT1 being sent to the membrane or even being exocytosed after its internalization is discussed, as other intracellular targets for the recombinant toxin may be explored.

Key words: Phospholipases-D, *L. intermedia,* lipid rafts, endocytosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

FIGURA 2 – ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES DE MAIOR IMPORTÂNCIA MÉDICA NO PARANÁ.

FIGURA 3 – LESÃO CUTÂNEA RESULTANTE DE ACIDENTE COM ARANHA DO GÊNERO *LOXOSCELES.*

FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS DO VENENO E DA GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO DE *L. INTERMEDIA*

FIGURA 5 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *L. INTERMEDIA*

FIGURA 6 – ESTRUTURA DO CRISTAL REFERENTE À LIRECDT1.

FIGURA 7 – REORGANIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA E AGREGAÇÃO DE *LIPID RAFTS* INDUZIDA PELA LIRECDT1.

FIGURA 8 – EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES E DO PERFIL DO VENENO DE *L. INTERMEDIA* POR SDS/PAGE.

FIGURA 9 – ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DA LIRECDT1, LIRECDT1/GFP E LIRECDT1/H12A.

FIGURA 10 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC LOGO APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

FIGURA 11 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 1 HORA APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

FIGURA 12 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 2 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

FIGURA 13 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 4 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

FIGURA 14 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 6 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

FIGURA 15 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 24 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

FIGURA 16 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DOS ANTICORPOS SECUNDÁRIOS COM CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC.

FIGURA 17 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA GFP COM CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC.

FIGURA 18 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.

FIGURA 19 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

FIGURA 20 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.

FIGURA 21 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

FIGURA 22 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.

FIGURA 23 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

FIGURA 24 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – ANÁLISE POR MICROSCOPIA TIRF.

FIGURA 25 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – ANÁLISE POR MICROSCOPIA TIRF.

FIGURA 26 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – ANÁLISE POR MICROSCOPIA TIRF.

FIGURA 27 – ISOLAMENTO DE *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE.

FIGURA 28 – AVALIAÇÃO POR HPTLC DE ESTERÓIS PRESENTES NAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS OU NÃO EM *LIPID RAFTS* APÓS FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE.

FIGURA 29 – AVALIAÇÃO POR HPTLC DE FOSFOLIPÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS OU NÃO EM *LIPID RAFTS* APÓS FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE.

FIGURA 30 – AVALIAÇÃO POR HPTLC DE GLICOLIPÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS OU NÃO EM *LIPID RAFTS* APÓS FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE.

FIGURA 31 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC E INTERNALIZAÇÃO VIA CAVEOLAS APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.

FIGURA 32 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1.

FIGURA 33 – INTERNALIZAÇÃO DA LiRecDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL

FIGURA 34 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2.

FIGURA 35 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

FIGURA 36 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1.

FIGURA 37 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

FIGURA 38 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2.

FIGURA 39 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

FIGURA 40 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1.

FIGURA 41 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

FIGURA 42 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2.

FIGURA 43 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VISÃO GERAL DAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DESCRITAS DAS PRINCIPAIS TOXINAS PRESENTES NOS VENENOS DE *Loxosceles.*

TABELA 2 – CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA LALP3 EM SISTEMA PROCARIÓTICO (CEPAS DE *E. coli*)

TABELA 3 – CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA LALP3 EM SISTEMA EUCARIÓTICO (CEPAS DE *Pichia pastoris*)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A: Alanina

AA: ácido araquidônico

APS: Persulfato de amônio

BSA: albumina sérica bovina

Cys: Cisteína

˚C: Grau Celsius

CT-B: do Inglês, *Cholera Toxin B Subunit*

C1P: Ceramida 1-Fosfato

D.O.: Densidade óptica

DAPI: do Inglês, *4,6-diamidino-2-phenylindole dihydro-chloride*

DIC: do inglês, *Differential Interface Contrast*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EBSS: do Inglês, *Earl Balanced Saline Solution*

EDTA: do Inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGTA: do Inglês, *Triethyleneglycol diamine tetraacetic acid*

E. coli: *Escherichia coli*

g: Grama

GFP: do Inglês, *Green Fluorescent Protein*

GM1: do Inglês, *monosialotetrahexosylganglioside* 1

GSD: do Inglês, *Ground State Depletion*

xg: Giro

h: Hora

H: Histidina

HPTLC: do Inglês, *High-Performance Thin-Layer Chromatography*

ICAM-1: do Inglês, *Intercellular Adhesion Molecule* 1

IL (1,6,8…): interleucina (1,6,8…)

IPTG : Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

IRA: Insuficiência renal aguda.

kDa: quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)

L: Litro

LAMP: do Inglês, *Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein*

LB: Luria-Bertani

LiRecDT: do inglês, *Loxosceles intermedia Recombinat Dermonecrotic Toxin*

LPA: Ácido Lisofosfatídico

M: Mol por litro

MES: do Inglês, *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mM: Milimol por litro

Ni-NTA: níquel-nitriloacetato

NF- Kβ: fator nuclear kappa beta

nm: Nanômetros

PA: ácido fosfatídico

PAF: fator ativador de plaquetas

PBS: do inglês, *Phosphate Buffered Saline*

PC: fosfatidilcolina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial de hidrogênio

PL: fosfolipase

cPLA: fosfolipase A2 citosólica

RAEC: do Inglês, *Rabbit Aorta Endothelial Cells*

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecilsulfato de Sódio

SDS-PAGE: do Inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel Electrophoresis*

SFB: soro fetal bovino

SM: esfingomielina

SMase: Esfingomielinase

SOC: do Inglês, *Super Optimal Broth*

TCA: do Inglês, *trichloroacetic acid*

TCTP: do inglês, *Translationally Controlled Tumor Protein*

TEMED: N,N,N’N’-dimetilaminoetano

TeNT: do Inglês, *Tetanus Neurotoxin*

TIRF: do Inglês, *Total Internal Reflection Fluorescence*

TNE: Tris, NaCl, EDTA

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

UFPR: Universidade Federal do Paraná

UV: ultravioleta

v/v: proporção volume/volume

VCAM-1: do Inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule* 1

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µM: Micromol por litro

α: Alfa

β: Beta

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO 1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1 Aranhas do gênero Loxosceles 4
2.2 Loxoscelismo 6
2.3 Veneno Loxoscélico 9
2.4 Fosfolipases-D do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* 13
2.5 Aspectos estruturais das fosfolipases-D de *Loxosceles* 14
2.6 Substratos lipídicos das Fosfolipases-D do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* 16
2.7 Efeitos de toxinas do veneno Loxoscélico sobre o endotélio 18
2.8 Interação de toxinas com microdomínios de membrana caracterizados por *lipid rafts* 20
3.0 JUSTIFICATIVA 23
4.0 OBJETIVOS 25
4.1 Objetivos Gerais 25
4.2 Objetivos Específicos 25
5.0 MATERIAL E MÉTODOS 26
5.1 Extração do veneno 26
5.2 Transformação das construções em *E. coli* BL21(DE3)pLysS 26
5.3 Expressão e purificação das fosfolipases-D recombinantes 27
5.4 Análise da expressão das fosfolipases-D recombinantes por SDS-PAGE 28
5.5 Ensaios de caracterização bioquímica e funcional de fosfolipases 29
5.7 Cultivo celular 30
5.8 Reações de imunomarcação para Microscopia de Fluorescência Confocal 32
5.9 Reações de imunomarcação para Microscopia de Super-resolução (SR-GSD) 33
5.10 Isolamento de *lipid rafts* das células RAEC por ultracentrifugação em gradiente de sacarose e análise por western-blotting 33
5.11 Análise da composição lipídica de frações enriquecidas em *lipid rafts* por cromatografia de alta performance em camada delgada (HPTLC) 35
6.0 Resultados 37
6.1 Obtenção do veneno e das toxinas recombinantes e verificação da citotoxicidade sobre células RAEC 37
6.1.1 Obtenção das toxinas recombinantes do tipo fosfolipase-D: isoformas LiRecDT1, LiRecDT1/GFP e LiRecDT1/H12A 37
6.1.3 Alterações morfológicas causadas pelo veneno e pela LiRecDT1 em células RAEC por microscopia de contraste de fase 40
6.2 Avaliação da interação da LiRecDT1/GFP com microdomínios de membrana de células RAEC 47

6.2.1 Interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* de células RAEC observada por microscopia de fluorescência confocal..... 48

6.2.2 Interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* células RAEC observada por microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRF)..... 59

6.2.3 Isolamento de *lipid rafts* de células RAEC por ultracentrifugação em gradiente de sacarose e identificação por *western-blot* 65

6.2.4 Padronização da análise do conteúdo lipídico do fracionamento do extrato de células RAEC por HPTLC 66

6.2.5 Interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* de células RAEC observada por microscopia de super-resolução..... 70

6.3 Avaliação da internalização da LiRecDT1/GFP em células RAEC..... 72

6.3.1 Endereçamento da LiRecDT1/GFP para o sistema endossomo/lisossomo de células RAEC por microscopia confocal 72

7.0 DISCUSSÃO 87

8.0 CONCLUSÃO 109

9.0 REFERÊNCIAS..... 110

ANEXO I 131

CONTINUAÇÃO DA TABELA 3 132

ANEXO II 133

1.0 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) são animais de pequeno porte conhecidas como aranhas-marrons devido à coloração que varia de marrom-claro a marrom-escuro; e como aranhas-violino, pois apresentam uma marca com o formato de um violino na região dorsal do cefalotórax. (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004). Acredita-se que o veneno deste animal tem como função paralisar e matar as presas, bem como iniciar a digestão das mesmas. Porém, estas aranhas não são agressivas e picam apenas como uma forma de auto-defesa, de modo que a maioria dos acidentes ocorre quando comprimidas contra o corpo no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se, ou durante o sono (RASH e HODGSON, 2002; VETTER e ISBISTER, 2008; ISBISTER e FAN, 2011). Apenas na região Sul do Brasil, são reportadas em média mais de 3000 ocorrências anualmente (SISTEMA DE INFORMAÇÂO DE AGRAVOS E NOTIFICAÇÂO, 2016).

Após a picada por aranhas do gênero *Loxosceles*, o conjunto de manifestações clínicas decorrentes do envenenamento é denominado loxoscelismo, sendo que este pode se apresentar em dois quadros que podem ou não ocorrer concomitantemente: o quadro cutâneo e o quadro sistêmico (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004). O loxoscelismo cutâneo é geralmente caracterizado por efeitos como edema, isquemia do tecido local e lesões dermonecróticas com espalhamento gravitacional (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011). Já o loxoscelismo sistêmico é caracterizado principalmente por coagulação intravascular disseminada, agregação plaquetária, hemoglobinúria e insuficiência renal aguda, que pode levar a obito (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004).

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* é um líquido cristalino composto por diversas enzimas, peptídeos, e nucleotídeos com massa molecular variando de 5-45 kDa. Dentre os componentes do veneno, destacam-se as metaloproteases, hialuronidases, peptídeos inseticidas e fosfolipases-D, e acredita-se que a ação do veneno é decorrente da ação sinérgica das toxinas do mesmo (GREMSKI *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2014).

As fosfolipases-D destas aranhas são as enzimas do veneno que se encontram melhor caracterizadas do ponto de vista estrutural, bioquímico e

biológico (CHAIM *et al.*, 2011b; GREMSKI *et al.*, 2014). São enzimas com massa molecular aproximada de 32-35 kDa, e estão presentes em diversas espécies do gênero, entre elas *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho*, *L. similis*, e *L. reclusa* (DE SANTI FERRARA *et al.*, 2009; VETTER, 2011; MAGALHAES *et al.*, 2013; GREMSKI *et al.*, 2014; DANTAS *et al.*, 2016). Já foi reportado que estas toxinas induzem experimentalmente dermonecrose (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011a), resposta inflamatória (PALUDO *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011a) agregação plaquetária (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008), hemólise (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011), aumento da permeabilidade vascular (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008), nefrotoxicidade (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008) e efeitos citotóxicos em células de rim canino (MDCK) (RIBEIRO *et al.*, 2007).

As fosfolipases-D de aranhas-marrons possuem como substratos lipídicos principalmente a esfingomielina e a lisofosfatidilcolina. Após hidrolisarem estes substratos, são gerados metabólitos bioativos conhecidos, como a ceramida-1-fosfato, decorrente da hidrólise da esfingomielina, e o ácido lisofosfatídico, decorrente da hidrólise da lisofosfatidilcolina (LEE e LYNCH, 2005; LAJOIE *et al.*, 2013). Acredita-se que a liberação desses metabólitos pode estar associada à modulação de processos inflamatórios, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas por diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais (GOMEZ-MUNOZ *et al.*, 2013; HORTA *et al.*, 2013; RIVERA *et al.*, 2015; STODDARD e CHUN, 2015).

O endotélio está diretamente associado à resposta inflamatória, uma vez que células endoteliais produzem substâncias vasoativas, como as citocinas IL-1β, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNFα) e proteína C-reativa de fase aguda (CPR), durante o processo inflamatório. Ainda, o aumento sérico dessas citocinas leva ao aumento da expressão de selectinas, VCAM-1 e ICAM-1 (SZMITKO *et al.*, 2003), proteínas transmembrânicas de adesão associadas ao recrutamento de leucócitos para o local da lesão (POBER e SESSA, 2007).

Existem evidências de que as fosfolipases-D de *L. intermedia* são capazes de promover, em coelhos, a formação de vacúolos subendoteliais, formação de bolhas, degeneração da membrana celular, formação de fibrina e trombos e acumulação massiva de leucócitos polimorfonucleares, dentro e ao redor dos vasos (VEIGA *et al.*, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002). Ainda, células

endoteliais expostas a estas toxinas *in vitro* sofreram alterações morfológicas como retração celular, aumento de filopódios, ausência de lamelipódios, desadesão da matriz extracelular e formação de estruturas globulares na superfície celular (PALUDO *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que estas fosfolipases-D são capazes de se ligar à membrana de células endoteliais, promover a agregação de *lipid rafts*, promover vacuolização e retração de volume celular, e induzir inflamação (CHAIM *et al.*, 2011a).

Sabe-se ainda que toxinas do veneno de *L. intermedia* são internalizadas e endereçadas ao sistema endossomo/lisossomo após interagirem com a membrana de células endoteliais (NOWATZKI *et al.*, 2010), e que a interação com a membrana plasmática e subsequente endocitose é um processo relativamente comum para determinadas toxinas, como as toxinas bacterianas Shiga, de *Shigella dysenteriae* (KOVBASNJUK *et al.*, 2001)*;* CT-B, de *Vibrio cholerae* (TORGERSEN *et al.*, 2001)*;* TeNT, de *Clostridium tetani* (HERREROS *et al.*, 2001)*;* e também toxinas de serpentes, como as crotoxinas, da cascavel *Crotalus durissus terrificus* (OLLIVIER-BOUSQUET *et al.*, 1991; PARTON e RICHARDS, 2003). Estas toxinas interagem especificamente com microdomínios de membrana denominados *lipid rafts*, os quais são enriquecidos em colesterol e esfingolipídeos, e exercem papéis cruciais em diversos processos celulares, como modulação da transdução de sinais, organização do citoesqueleto, adesão celular e migração e seleção de lipídios e proteínas para diferentes membranas (SIMONS e IKONEN, 1997; MUNRO, 2003; CHIANTIA e LONDON, 2013).

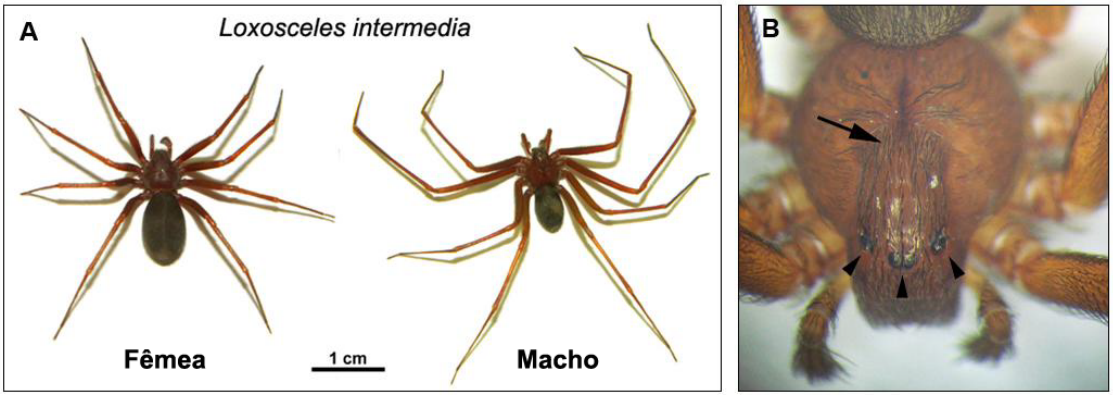
Assim, tendo em vista que moléculas do veneno de *L. intermedia* são internalizadas e endereçadas ao sistema endossomo/lisossomo, que as fosfolipases-D destas aranhas interagem com a membrana plasmática de células endoteliais, promovem a reorganização de *lipid rafts*, e estão associadas ao desenvolvimento do processo inflamatório, fez-se necessária a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na interação destas toxinas com a membrana e da possível internalização da mesma, buscando determinar o seu destino intracelular, e associar tais eventos à citotoxicidade causada por estas enzimas.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aranhas do gênero Loxosceles

As aranhas do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) são animais de pequeno porte popularmente conhecidas como aranhas-marrons, uma vez que sua coloração varia de marrom-claro a marrom-escuro. Além disso, também são conhecidas como aranhas-violino, uma vez que apresentam uma marca com o formato de um violino na região dorsal do cefalotórax. Outra característica destas aranhas é a posição e número de olhos, dispostos em três díades formando um semicírculo (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004). Estas aranhas apresentam tamanho variável, sendo que o corpo varia de 8 a 15 mm, e suas pernas podem medir até 30 mm de comprimento. Ainda, o dimorfismo sexual é característico no genero *Loxosceles*, de modo que os machos possuem corpo menor e pernas mais alongadas em comparação com as fêmeas (Figura 1) (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004).

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*



(A) Aranhas da espécie *Loxosceles intermedia* adultas – fêmea e macho. (B) Marca com formato semelhante ao de um violino no cefalotórax (flecha), e disposição dos olhos em três pares formando um semi-circulo (pontas de flechas). Adaptado de Chaim e colaboradores (2011b).

As aranhas-marrons são cosmopolitas e podem ser encontradas na África, Ásia, Américas, Europa e Austrália (DA SILVA *et al.*, 2004; BINFORD *et al.*, 2008; PLATNICK, 2016). Devido a sua alta capacidade de dispersão, período de vida relativamente longo (3 a 7 anos), e adaptação a condições adversas, como longos períodos sem alimento ou água e grandes variações de temperatura, estas aranhas foram capazes de colonizar áreas urbanas, sendo particularmente comuns no ambiente domiciliar (FISCHER e VASCONCELLOS-NETO, 2005; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; TAMBOURGI *et al.*, 2010; CHATZAKI *et al.*, 2012). As aranhas do gênero *Loxosceles* geralmente se alimentam de presas vivas, contudo, foi verificado que a espécie *Loxosceles reclusa* possui preferência por presas já mortas (DA SILVA et al., 2004; SANDIDGE, 2003). É postulado que a função primária do veneno destes animais é paralisar e matar as presas, bem como iniciar a digestão das mesmas. Contudo, apesar de fazerem parte de um dos gêneros geralmente envolvidos em acidentes com humanos, as aranhas-marrons não possuem comportamento agressivo e picam apenas como uma forma de auto-defesa, de modo que a maioria dos acidentes ocorre quando comprimidas contra o corpo no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se, ou durante o sono (RASH e HODGSON, 2002; VETTER e ISBISTER, 2008; ISBISTER e FAN, 2011).

No Brasil, a incidência de 14 espécies de aranhas-marrons já foi relatada, dentre elas, quatro endêmicas do país (TAMBOURGI *et al.*, 2010; PLATNICK, 2016). Acidentes envolvendo aranhas-marrons são comuns, a ponto de tornarem-se um problema de saúde pública, visto que a ocorrência de acidentes loxosélicos no país é de mais de 8000 casos por ano, sendo em média mais de 3000 ocorrências na região Sul (GREMSKI *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2014). No estado do Paraná, é comum a presença de quatro espécies, sendo a *Loxosceles intermedia* a espécie mais abundante, seguida das espécies *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta*, e *Loxosceles hirsuta*, de modo que as três primeiras estão diretamente envolvidas em acidentes com humanos (Figura 2), adquirindo carater de importância médica. Ainda não há registros na literatura de

acidentes com humanos provocados pela espécie *L. hirsuta* (DA SILVA *et al.*, 2004; MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005; CHAIM *et al.*, 2011b).

FIGURA 2 – ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES DE MAIOR IMPORTÂNCIA MÉDICA NO PARANÁ.

Adaptado de Trevisan-Silva e colaboradores (2010).

2.2 Loxoscelismo

O termo loxoscelismo é empregado para caracterizar o conjunto de manifestações clínicas decorrentes do envenenamento induzido pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles.* Pode-se apresentar em dois quadros que podem ocorrer concomitantemente ou não, denominados loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico, também conhecido como loxoscelimo vicerocutâneo ou loxoscelimo cutâneo-hemolítico (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004).

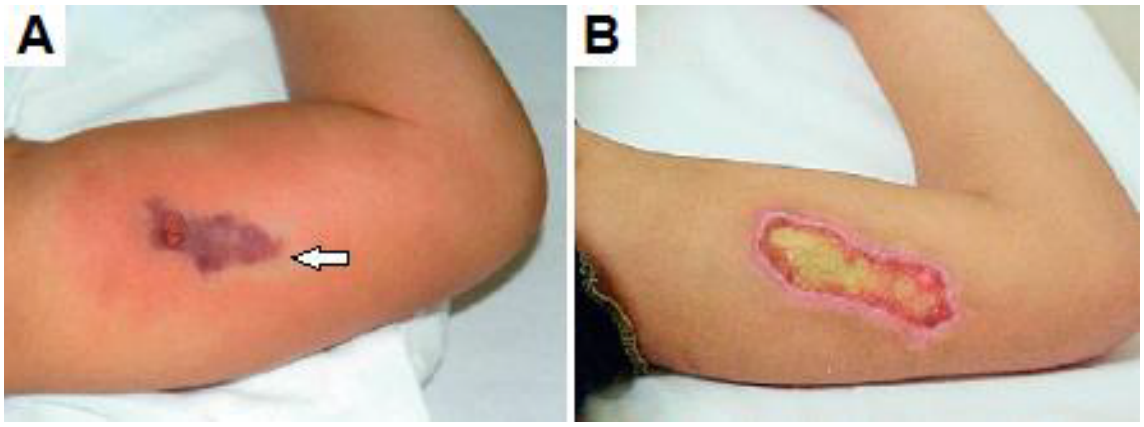
A gravidade e a progressão das manifestações clínicas observadas durante o envenenamento estão associados à quantidade de veneno injetada

(FUTRELL, 1992; MCGLASSON *et al.*, 2007), à região onde ocorreu a picada e à condição do acidentado (BARBARO *et al.*, 1994). Além disso, fatores que influenciam nas manifestações clínicas decorrentes da picada envolvem a espécie, o sexo, e o estágio de desenvolvimento da aranha (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; MALAQUE *et al.*, 2011; CHATZAKI *et al.*, 2012).

O loxoscelismo cutâneo é o quadro clínico relacionado ao local da picada e apresenta predominância na maioria dos casos (84 a 97%). Os sinais e sintomas geralmente observados após a picada são dor leve e eritema, sendo que ao longo do desenvolvimento da lesão, após algumas horas, podem ser observados sintomas como edema, isquemia do tecido local, hemorragia, e lesões dermonecróticas com espalhamento gravitacional, além da formação da placa marmórea, uma área de tecido isquêmico circundada por um halo vermelho e zonas pálidas (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; CHATZAKI *et al.*, 2012) (Figura 3A).

A observação de necrose geralmente ocorre após 72 horas, e em casos onde não há tratamento, após 5 a 7 dias, a lesão evolui resultando na formação de uma escara de difícil cicatrização. Por fim, após 2 a 3 semanas, pode ocorrer a formação de úlceras crônicas e destruição do tecido local (Figura 3B), de modo que a intervenção cirúrgica pode ser necessária para reparação do tecido na região da lesão dermonecrótica (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; ISBISTER e FAN, 2011). Além disso, acredita-se que o quadro cutâneo pode ser acentuado devido à presença do bacilo gram positivo *Clostridium perfringens*, uma vez que este organismo pode ser encontrado nas quelíceras das aranhas-marrons, podendo este ser introduzido em conjunto com o veneno no ato da picada (MONTEIRO *et al.*, 2002).

FIGURA 3 – LESÃO CUTÂNEA RESULTANTE DE ACIDENTE COM ARANHA DO GÊNERO *LOXOSCELES.*



(A) Lesão visualizada 24 horas após o acidente evidenciando eritema, edema, e a placa marmórea (seta). (B) Lesão visualizada 25 dias após o acidente, evidenciando necrose tecidual. Adaptado de Isbister e Fan (2011).

O loxoscelismo sistêmico é comumente relacionado a casos mais severos, porém ocorre com menor frequência se comparado ao loxoscelismo cutâneo. Além disso, é reportado que o desenvolvimento do loxoscelismo sistêmico em pacientes que sofreram a picada varia de acordo com a espécie envolvida no acidente (SEZERINO *et al.*, 1998; MALAQUE *et al.*, 2002; MCDADE *et al.*, 2010).

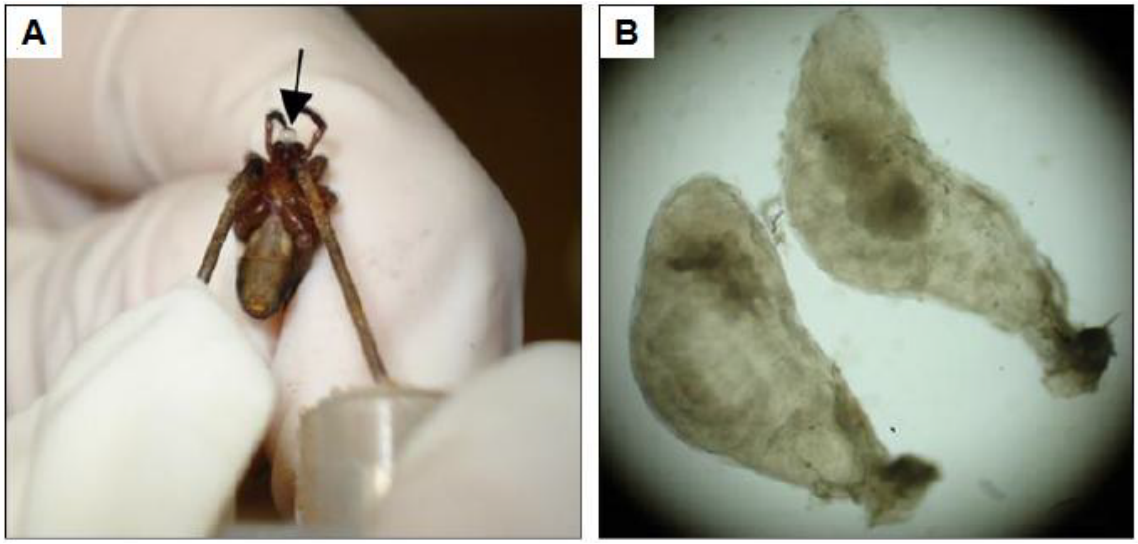
O sintoma característico do loxoscelismo sistêmico é a anemia hemolítica intravascular, porém, sintomas como astenia, febre, alterações sensoriais, cefaléia, convulsões e até mesmo coma, podem ser observados em alguns casos (MCDADE *et al.*, 2010; ISBISTER e FAN, 2011; ROSEN *et al.*, 2012). Em casos mais graves, podem ocorrer alterações no quadro hemolítico como coagulação intravascular disseminada e trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária, além de outros distúrbios como a redução do hematócrito, aumento de bilirrubina indireta, icterícia, hemoglobinúria e insuficiência renal aguda (IRA) (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011). Em algumas situações, distúrbios vasculares nas regiões pulmonar e hepática também podem ocorrer (LUNG e MALLORY, 2000), e, apesar da baixa incidência, em alguns casos pode ocorrer óbito devido a

distúrbios hematológicos e lesões renais (DA SILVA *et al.*, 2004; ROSEN *et al.*, 2012).

2.3 Veneno Loxoscélico

O veneno loxoscélico é um fluído cristalino composto por enzimas, peptídeos e nucleotídeos (Figura 4A), produzido por um par de glândulas localizado no cefalotórax do animal (Figura 4B) (FUTRELL, 1992; DOS SANTOS *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2004).

FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS DO VENENO E DA GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO DE *L. INTERMEDIA*



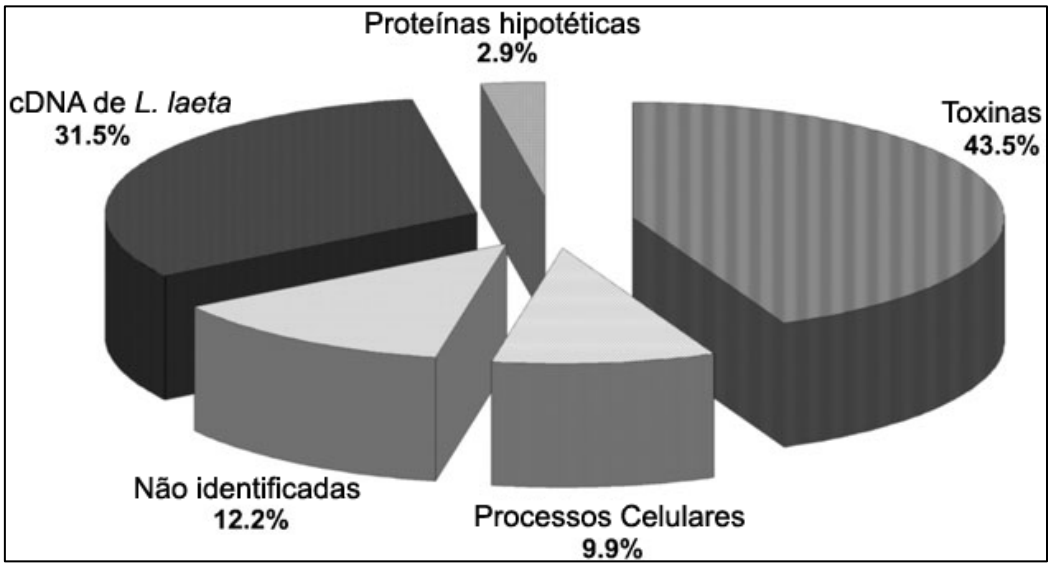
(A) Veneno cristalino (seta) secretado após a aplicação do eletrochoque ao cefalotórax da aranha. (B) Par de glândulas produtoras de veneno visualizadas sob microscopia de luz convencional. Aumento de 40x. Adaptado de Chaim e colaboradores (2011b).

Análises eletroforéticas demonstraram que o perfil protéico dos venenos de diferentes espécies do gênero *Loxosceles* apresenta predominantemente moléculas de baixa massa molecular (5-45 kDa) (DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004). No momento da picada, aranhas adultas inoculam um volume pequeno de veneno, constituindo alguns microlitros do mesmo, de modo que é injetado cerca de 20µg a 200µg de toxinas - moléculas de natureza proteica com ação tóxica e/ou enzimática (BINFORD e WELLS, 2003; CHAIM *et*

al., 2011b; GREMSKI *et al.*, 2014). Contudo, é importante ressaltar que a espécie, o tamanho, e sexo destas aranhas, bem como a disposição de alimento, podem ser determinantes para a quantidade de veneno a ser produzida pelas mesmas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

A busca pela identificação de toxinas do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* é constantemente realizada. A análise do transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. laeta* revelou que aproximadamente 16% dos transcritos correspondem a sequências codificantes para toxinas descritas como metaloproteases, fosfolipases-D, serino-proteases, e hialuronidases (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). Um segundo estudo envolvendo o transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* evidenciou que aproximadamente 43% dos transcritos correspondem a toxinas (Figura 5), dentre elas diversas isoformas de fosfolipases-D, peptídeos potencialmente inseticidas, neurotoxinas, serino-proteases, proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP), alérgenos, hialuronidases, inibidor de serino-proteases, e metaloproteases (GREMSKI *et al.*, 2010). Ainda, a análise do proteoma do veneno de *L. intermedia* permitiu a identificação de proteínas com massa molecular variando entre 14 a 95 kDa, dentre elas metaloproteases, serino-proteases, hialuronidases, esfingomielinases, inibidores de serino-proteases, além de possíveis neurotoxinas e alérgenos (DOS SANTOS *et al.*, 2009).

FIGURA 5 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *L. INTERMEDIA*



Adaptado de Gremski e colaboradores (2010).

Corroborando os dados obtidos pelos transcriptomas e proteoma, é reportada extensivamente na literatura a identificação de diversas toxinas dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, dentre elas: fosfatase alcalina, 5'-nucleotídeo fosfohidrolases (FUTRELL, 1992), nucleosídeos sulfatados (SCHROEDER *et al.*, 2008), hialuronidades (YOUNG e PINCUS, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; FERRER *et al.*, 2013), fosfolipases-D (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; APPEL *et al.*, 2008; BINFORD *et al.*, 2009; MAGALHAES *et al.*, 2013; VUITIKA *et al.*, 2013), serino-proteases (VEIGA *et al.*, 2000a), metaloproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000b; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b; DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013; MORGON *et al.*, 2016), alérgenos (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2009), proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP) (SADE *et al.*, 2012), e toxinas inseticidas (DE CASTRO *et al.*, 2004; MATSUBARA *et al.*, 2016; MEISSNER *et al.*, 2016).

Apesar grande variedade de toxinas do veneno, acredita-se que sua ação é decorrente do efeito sinérgico de todos os seus constituintes, e não de uma única molécula agindo isoladamente (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005;

KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). Uma vez que as toxinas supracitadas estão associadas a diferentes efeitos biológicos, estes são mostrados de forma resumida na Tabela 1.

TABELA 1- VISÃO GERAL DAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DESCRITAS DAS PRINCIPAIS TOXINAS PRESENTES NOS VENENOS DE *Loxosceles*

TOXINA	**MASSA MOLECULAR**	**EVENTOS BIOLÓGICOS DESCRITAS**
Fosfolipases-D	30-35 kDa	Várias isoformas com diferentes atividades: - Dermonecrose. - Hidrólise de fosfolípideos. - Hemólise. - Agregação plaquetária. - Atividade inflamatória. - Edema. - Distúrbio Renal. - Letalidade. - Citotoxicidade *"in vitro".*
Peptídeos inseticidas	5-8 kDa	- Peptídeos relacionados à Magi 3. - LiTx: Letal para *S. frugiperda* (paralisia flácida). - LiTx3: atua sobre canais de Na+.
Metaloproteases	28-35 kDa	- Metaloproteases do tipo Astacinas (LALPs). - Presente no veneno de diferentes espécies de *Loxosceles*. - Atividade hidrolítica sobre gelatina, fibronectina, fibrinogênio e entactina.
Hialuronidases	41-43 kDa	- Classificadas como hidrolases do tipo endo-β- Nacetyl-d hexosaminidases. - Atividade degradadora sobre ácido hialurônico e condroitin-sulfato. - Presente no veneno de diferentes espécies de *Loxosceles*. - Fator de espalhamento gravitacional.
Serinoproteses	85-95 kDa	- Atividade gelatinolítica. - Ativada *in vitro* pela tripsina. - Presente no veneno de *L. intermedia* e *L. laeta.*
Inibidor de Serinoproteases	N.D.	- Pertencente à família das Serpinas. - Identificada em transcriptomas e proteomas de *Loxosceles* sp. - Relacionada aos processos de coagulação, fibrinólise e inflamação.

Adaptado de Chaim e colaboradores (2011b).

2.4 Fosfolipases-D do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*

As fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles*, também conhecidas como esfingomielinases-D (30 - 35kDa), são as enzimas que se encontram melhor caracterizadas em relação à sua estrutura e atividade bioquímica e biológica (DE SANTI FERRARA *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011b; VETTER, 2011; MAGALHAES *et al.*, 2013; GREMSKI *et al.*, 2014; DANTAS *et al.*, 2016). Estas enzimas foram primeiramente denominadas esfingomielinases-D devido a sua atividade hidrolítica sobre a esfingomielina, porém posteriormente foi demonstrado que estas enzimas também são capazes de hidrolisar outros fosfolipídeos, sendo então denominadas fosfolipases-D (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; CHAIM *et al.*, 2011a). Ainda, as fosfolipases-D do veneno aranhas do gênero *Loxosceles* também são conhecidas como proteínas/toxinas dermonecróticas, por serem capazes de induzir a dermonecrose característica durante a evolução do loxoscelismo cutâneo (APPEL *et al.*, 2005).

A identificação e caracterização de toxinas dermonecróticas das várias aranhas que compõem o gênero ainda está sob constante investigação. Análises do perfil do veneno destas aranhas evidenciaram que as fosfolipases-D são conservadas entre as espécies de *Loxosceles.* Até então, 4 isoformas ativas desta toxina, com aproximadamente 32 kDa, e capazes de induzir dermonecrose, hemólise, e agregação plaquetária, foram descritas no veneno de *L. reclusa* (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004; VETTER, 2011). No veneno de *L. similis*, 23 sequências de RNA codificantes para fosfolipases-D foram descritas, porém, ainda não há fosfolipases recombinantes caracterizadas para esta espécie (DANTAS *et al.*, 2016). Duas isoformas de fosfolipases-D, denominadas SMase I e SMase II (32 kDa e 35 kDa, respectivamente) foram descritas no veneno de *L. laeta*, estando associadas à hemólise e dermonecrose (TAMBOURGI *et al.*, 2000; MURAKAMI *et al.*, 2005; DE SANTI FERRARA *et al.*, 2009). Ainda no veneno de *L. laeta*,

duas isoformas recombinantes, denominadas rLlPLD1 eLlPLD2, foram descritas, sendo que a primeira possui atividade esfingomielinásica e hemolítica, e a segunda aparentemente é inativa (CATALAN *et al.*, 2011). A análise proteômica do veneno de *L. gaucho* evidenciou a existência de 11 isoformas de fosfolipases-D, denominadas Loxonecroginas (MACHADO *et al.*, 2005). Posteriormente, uma isoforma recombinante denominada LgRecDT1 foi obtida, sendo esta capaz de hidrolisar esfingomielina, induzir dermonecrose, promover agregação plaquetária e hemólise (MAGALHAES *et al.*, 2013).

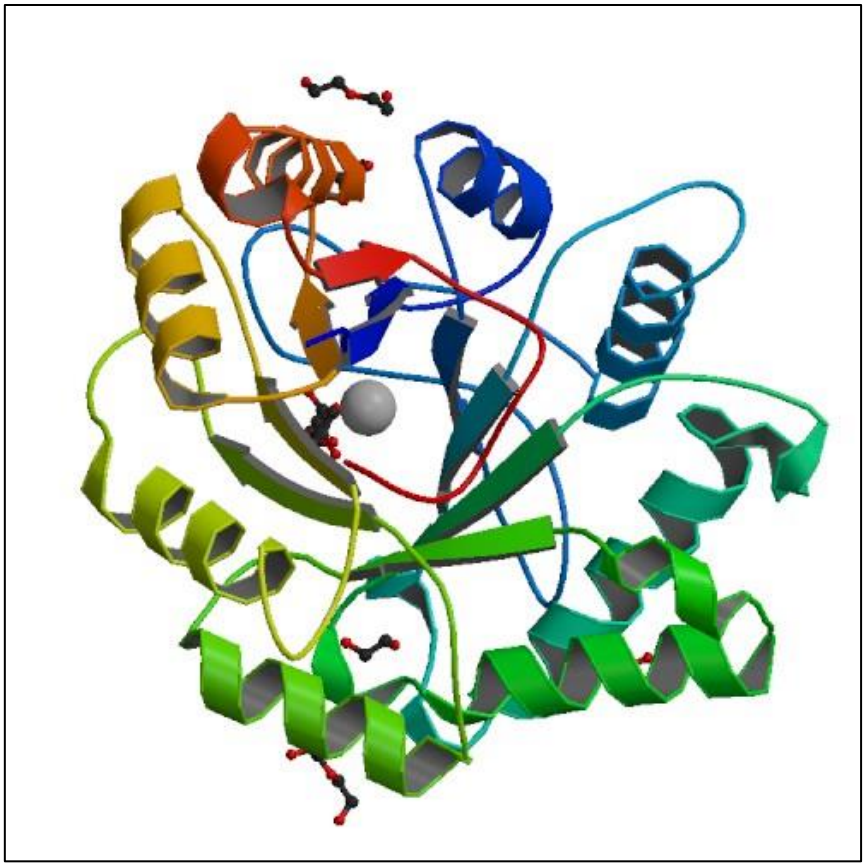
Em relação as fosfolipases-D de *L. intermedia*, inicialmente, a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno desta aranha, foram descritas 7 isoformas desta classe de toxinas, sendo estas denominadas *Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxins:* LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006), LiRecDT2 e LiRecDT3 (DA SILVEIRA *et al.*, 2006), LiRecDT4 e LiRecDT5 (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b), LiRecDT6 (APPEL *et al.*, 2008) e LiRecDT7 (VUITIKA *et al.*, 2013). Além disso, o transcriptoma do veneno de *L. intermedia* revelou que, além das isoformas supracitadas, novos transcritos identificados como prováveis isoformas de fosfolipases-D estão presentes no veneno (GREMSKI *et al.*, 2010). Posteriormente, em um estudo envolvendo a análise proteômica do veneno de *L. intermedia* por eletroforese em gel bidimensional, foi possível evidenciar 25 pontos imunologicamente reconhecidos como isoformas de fosfolipases-D (WILLE *et al.*, 2013).

2.5 Aspectos estruturais das fosfolipases-D de *Loxosceles*

Em relaçâo à sua estrutura, as fosfolipases-D de *Loxosceles* apresentam em média 284-285 resíduos de aminoácidos dispostos de maneira tal que sua estrutura terciária represente um barril distorcido composto por 8 β-folhas paralelas, interligadas por 8 alças flexíveis em α-hélice, formando a superfície da estrutura denominada TIM-barril ou $(\alpha/\beta)_8$ (Figura 6) (MURAKAMI *et al.*, 2005; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). Estas enzimas podem ser agrupadas em duas

classes, levando em consideração a estrutura, atividade catalítica e sequência aminoacídica. As fosfolipases-D da classe I são caracterizadas por 2 resíduos de cisteína que formam 1 única ponte dissulfeto (Cys51 e Cys57), estabilizando a alça catalítica que contém determinados resíduos de aminoácidos que fazem parte da fenda catalítica. Já as fosfolipases-D da classe II, representadas pelas fosfolipases de *L. intermedia*, são caracterizadas por 4 resíduos de cisteína que formam 2 pontes dissulfeto (Cys51 e Cys57, e Cys53 e Cys 201) que ligam as alças flexível e catalítica, de maneira que a fenda catalítica seja menos exposta à substratos lipídicos. Ainda, dependendo da hidrólise da esfingomielina, as fosfolipases-D da classe II são subdivididas em classe IIa (com isoformas ativas) e classe IIb (com isoformas pouco ativas ou inativas) (MURAKAMI *et al.*, 2006; DE GIUSEPPE *et al.*, 2011).

FIGURA 6 – ESTRUTURA DO CRISTAL REFERENTE À LIRECDT1.



Representação tridimensional da estrutura da LiRecDT1 evidenciando o formato de TIM-barril com as 8 β-folhas e α-hélices características da enzima. Adaptado de De Giuseppe e colaboradores (2011).

2.6 Substratos lipídicos das Fosfolipases-D do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*

As fosfolipases-D de *Loxosceles* possuem atividade sobre diferentes substratos lipídicos. Em relação à *L. intermedia*, dentre os fosfolipídeos de membrana hidrolisados destacam-se a esfingomielina (SM) e lisofosfatidilcolina (LPC), de modo que a atividade catalítica das fosfolipases-D sobre estas moléculas libera colina e, como produtos secundários, ceramida 1-fosfato (C1P) e ácido lisofosfatídico (LPA), respectivamente (LEE e LYNCH, 2005; LAJOIE *et al.*, 2013). Recentemente foi proposto que as fosfolipases-D de *Loxosceles* hidrolisam preferencialmente substratos lipídicos com carga positiva, como a colina, por exemplo, que por sua vez está presente nos principais substratos destas enzimas (esfingomielina e lisofosfatidilcolina) (LAJOIE *et al.*, 2015).

Além dos substratos lipídicos mencionados anteriormente, as fosfolipases-D de aranhas-marrons também são capazes, embora em menor intensidade, de hidrolisar fosfatidilcolina (PC) e fator ativador de plaquetas (PAF) liberando, além de colina, ácido fosfatídico (PA) como mediador lipídico (CHAIM *et al.*, 2011a). Esse mediador também está envolvido em diversas vias de sinalização, incluindo reestruturação do citoesqueleto, proliferação, sobrevivência e transporte vesicular (CAZZOLLI *et al.*, 2006). Ainda, tanto nas formas nativa como recombinante, estas toxinas são capazes de induzir experimentalmente dermonecrose (APPEL *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011a), resposta inflamatória (PALUDO *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011a), agregação plaquetária (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008), hemólise (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011), aumento da permeabilidade vascular (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008), nefrotoxicidade (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008) e efeitos citotóxicos em células de rim canino (MDCK) (RIBEIRO *et al.*, 2007).

O ácido lisofosfatídico (LPA) é um lipídeo bioativo semelhante à um fator de crescimento envolvido em diversos processos celulares, como proliferação e

diferenciação celular (PUSTILNIK *et al.*, 1999), rearranjo do citoesqueleto (MOOLENAAR, 1995), interações célula-célula (FUKUSHIMA *et al.*, 2002) e tumorigênese (KIM *et al.*, 2006). A geração do LPA extracelular pode ocorrer de pelo menos duas formas: 1) através da ação de fosfolipases sobre microvesículas provenientes de plaquetas ativadas e eritrócitos (FOURCADE *et al.*, 1995; AOKI *et al.*, 2002; SANO *et al.*, 2002) ou 2) através da ação de fosfolipases-D sobre a lisofosfatidilcolina (NAKAMURA *et al.*, 2005; MURPH *et al.*, 2006). Especula-se também que a formação de LPA pode ocorrer através da atividade de fosfolipases-D sobre lisofosfatidilcolina circulante, como observado em um estudo com a toxina dermonecrótica de *L. laeta*, de modo que os autores consideram este um mecanismo que pode contribuir para a patogeneicidade da toxina (VAN MEETEREN *et al.*, 2004). Independente da via pela qual o LPA é gerado, este pode se ligar a receptores acoplados à proteína G, conhecidos como LPARs, e ativar vias de sinalização associadas à MAPK ou ERK1/2, estimulando a expressão de mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas, mitógenos e fatores pró-angiogênicos (VAN MEETEREN *et al.*, 2004; DURGAM *et al.*, 2006; YUNG *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014; STODDARD e CHUN, 2015). Ainda, foi demonstrado que o veneno total de *L. similis* e a fosfolipase-D recombinante de *L. laeta* LiD1, estimulam a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em fibroblastos humanos da linhagem HFF por mecanismos dependentes da liberação de LPA e sua interação com seus respectivos receptores LAPRs (HORTA *et al.*, 2013).

A ceramida-1-fosfato (C1P) pode ser produzida diretamente pela hidrólise de esfingomielina ou sintetizada pela fosforilação de ceramida pela ceramida quinase (CERK) (GOMEZ-MUNOZ *et al.*, 2013; MACEYKA e SPIEGEL, 2014). A ceramida está envolvida em diversos processos inflamatórios, seja através do estímulo de fosfolipases A2 citosólicas, que por sua vez levariam à geração subsequente de prostaglandinas; ou através do estímulo de esfingomielinases ácidas, envolvidas na formação de edema mediado por fator ativador de

plaquetas (PAF) (HAYAKAWA *et al.*, 1996; GOGGEL *et al.*, 2004; CHALFANT e SPIEGEL, 2005; GOMEZ-MUNOZ *et al.*, 2013).

Os efeitos pró-inflamatórios associados à ceramida podem ser também mediados pela ceramida-1-fosfato. A C1P, por exemplo, interage com a cPLA2 induzindo sua translocação do citosol para membrana perinucleares, como a membrana do complexo de Golgi, e intensificando a associação dessa enzima com fosfatidilcolina. Assim, cPLA2 degrada este fosfolipídeo, gerando ácido araquidônico (AA), que depois será metabolizado em outros eicosanoides como a prostaglandina (CHALFANT e SPIEGEL, 2005; GOMEZ-MUNOZ *et al.*, 2013; HOEFERLIN *et al.*, 2013). Este evento reforça a ideia de que os mecanismos pelos quais a C1P induz eventos pro-inflamatórios podem estar relacionados aos efeitos inflamatórios decorrentes da ação do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (RIVERA et al., 2015). Além disso, especula-se que a atividade de fosfolipases-D sobre a membrana plasmática, resultando na geração de C1P, pode estar relacionada ao aumento de moléculas inflamatórias, como IL-6, IL-8 e NF-Kβ, consistindo em um segundo mecanismo pelo qual a C1P pode contribuir para a resposta inflamatória gerada pelo veneno loxoscélico (DRAGULEV *et al.*, 2007). Ainda, flutuações dos níveis de C1P estão associados a processos celulares como fagocitose, ativação de canais de íons, inflamação, sobrevivência celular e tumorigênese (STOCK *et al.*, 2012).

2.7 Efeitos de toxinas do veneno Loxoscélico sobre o endotélio

Uma vez que o endotélio está diretamente ligado a respostas inflamatórias, os efeitos do veneno total da *L. intermedia* sobre células endoteliais foram investigados e descritos em trabalhos anteriores (ZANETTI *et al.*, 2002; PALUDO *et al.*, 2006; NOWATZKI *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011a; NOWATZKI *et al.*, 2012). Essas células desempenham papéis fundamentais nos processos inflamatórios, alterando seus fenótipos para promover as etapas envolvidas na inflamação (POBER e SESSA, 2007). O endotélio é capaz de responder a sinais provenientes do sangue através da liberação de substâncias vasoativas, como as citocinas IL-1β, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNFα) e

proteína C-reativa de fase aguda (CPR). O aumento sérico dessas citocinas leva ao aumento da expressão de selectinas, VCAM-1 e ICAM-1 (SZMITKO *et al.*, 2003), proteínas transmembrânicas de adesão associadas ao recrutamento de leucócitos para o local da lesão (POBER e SESSA, 2007). Ainda, a liberação de interleucinas pode estar associada aos inflamassomos, complexos responsáveis pela ativação de caspases pró-inflamatórias, que atuam após ativação de receptores de membrana de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors* - PRR). A ligação de patógenos ou moléculas endógenas, liberadas por células danificadas ou em processo de morte programada, aos receptores PRR ativam caspases que clivam interleucinas pro-inflamatórias e promovem a liberação de moléculas associadas a sinais de perigo (BRYANT e FITZGERALD, 2009).

Estudos anteriores revelaram que, após a exposição de coelhos ao veneno de *L. intermedia*, foram observados vacúolos subendoteliais, formação de bolhas, degeneração da membrana celular, formação de fibrina e trombos e acumulação massiva de leucócitos polimorfonucleares, dentro e ao redor dos vasos (VEIGA *et al.*, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002). Ainda, ao avaliar células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) em cultivo *in vitro*, após expostas ao veneno de *L. intermedia*, foi verificado que estas sofreram alterações morfológicas como retração celular, aumento de filopódios, ausência de lamelipódios, desadesão da matriz extracelular, e formação de estruturas globulares na superfície celular. Além disso, foi verificado que esses efeitos citotóxicos diretos podem levar à ativação de leucócitos e plaquetas, e aumento da permeabilidade de vasos (PALUDO *et al.*, 2006).

Acredita-se que os efeitos do veneno de *L. intermedia* sobre diferentes tipos celulares sejam majoritariamente ocasionados pelas fosfolipases-D do veneno. Células da linhagem RAEC expostas à LiRecDT1 apresentaram alterações similares àquelas expostas ao veneno total, como vacuolização citoplasmática, redução do volume celular e presença de *debris* celular resultante da lise das mesmas. Além disso, foi verificado que a LiRecDT1 é

capaz de se ligar à superfície de células da linhagem RAEC de maneira tempo-dependente (CHAIM *et al.*, 2011a), corroborando resultados semelhantes obtidos com o veneno de *L. intermedia*, onde foi verificado que toxinas do veneno interagem com a superfície celular das células da linhagem RAEC, e que essas são internalizadas e endereçadas a vesículas do sistema endossomo/lisossomo (NOWATZKI *et al.*, 2010). Ainda, eritrócitos humanos expostos à LiRecDT1 promoveram alterações morfológicas e estruturais tais como alteração da fluidez da membrana, translocação de fosfatidilserina para o folheto extracelular e agregação de microdomínios ricos em colesterol contendo gangliosídeo GM1, evidenciando a interação da toxina com a membrana deste tipo celular e sugerindo sua possível ligação com microdomínios ricos em colesterol (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009).

2.8 Interação de toxinas com microdomínios de membrana caracterizados por *lipid rafts*

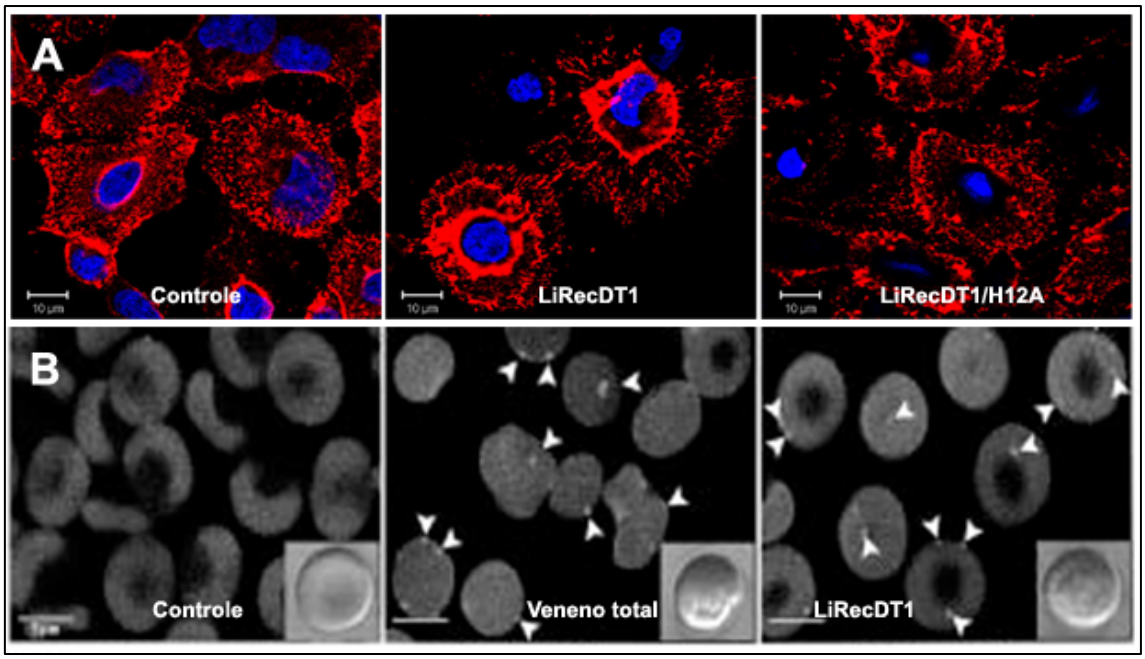
Balsas lipídicas, do inglês *lipid rafts*, são microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol e esfingolipídeos, e exercem papéis cruciais em diversos processos celulares, como modulação da transdução de sinais, organização do citoesqueleto, adesão celular e migração e seleção de lipídios e proteínas para diferentes membranas (SIMONS e IKONEN, 1997; MUNRO, 2003; CHIANTIA e LONDON, 2013). Além das *lipid rafts*, as plataformas ricas em ceramida, formadas a partir do acúmulo de ceramidas que interagem entre sí e com moléculas de colesterol, também influenciam as propriedades biofísicas das bicamadas lipídicas. Estas plataformas são responsáveis principalmente por fornecer suporte para o aprisionamento e agregação de receptores para ligantes presentes no meio extracelular, estando diretamente relacionadas com a transdução e amplificação de processos de sinalização celular (GRASSME *et al.*, 2001; MEGHA e LONDON, 2004; HENRY *et al.*, 2013). Ainda, juntamente com as *lipid rafts*, as plataformas ricas em ceramida estão associadas a pontos

de entrada de vírus, bactérias, e toxinas, levando à sua subsequente internalização (SHOGOMORI e FUTERMAN, 2001; GRASSME *et al.*, 2003; FALGUIERES *et al.*, 2006; DRESCHERS *et al.*, 2007; CHIANTIA e LONDON, 2013).

Diversas toxinas interagem com a membrana plasmática em estruturas específicas, como *lipid rafts*, e são subsequentemente internalizadas, tais como toxinas bacterianas como a toxina CT-B, de *Vibrio cholerae* (TORGERSEN *et al.*, 2001); a toxina Shiga, de *Shigella dysenteriae* (KOVBASNJUK *et al.*, 2001); a neurotoxina TeNT, de *Clostridium tetani* (HERREROS *et al.*, 2001); bem como do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*, a crotoxina (OLLIVIER-BOUSQUET *et al.*, 1991; TORGERSEN *et al.*, 2001; PARTON e RICHARDS, 2003). Uma vez dentro das células, as toxinas podem seguir pelo sistema endossomo-lisossomo, podem ser direcionadas para caveossomos, ou podem ser direcionadas para o complexo de Golgi (FALGUIERES *et al.*, 2001; IVERSEN *et al.*, 2001; PARTON e RICHARDS, 2003). Para algumas toxinas, a citotoxicidade depende de vias pós-endocíticas, desviando a rota de degradação em lisossomos e sendo translocadas para o retículo endoplasmático com subsequente liberação de moléculas bioativas no citosol (SCHAPIRO *et al.*, 1998; PARTON e RICHARDS, 2003; MCKENZIE *et al.*, 2009).

Em relação à fosfolipase-D de *L. intermedia*, além de ser capaz de se ligar à superfície celular de células endoteliais de aorta de coelho (CHAIM *et al.*, 2011a), esta promove a reorganização da membrana plasmática com agregação das *lipid rafts* tanto nas células endoteliais de aorta de coelho (CHAIM *et al*., 2008), quanto em eritrócitos humanos (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009) (FIGURA 7).

FIGURA 7 – REORGANIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA E AGREGAÇÃO DE *LIPID RAFTS* INDUZIDA PELA LIRECDT1.



(A) Reorganização da membrana plasmática e agregação de *lipid rafts* após exposição de células da linhagem RAEC à 50 µg/mL de LiRecDT1 e à LiRecDT1 H12A por 4 horas. É possível observar que as *lipid rafts*, marcadas em vermelho, apresentam agregação após a exposição à LiRecDT1. O mesmo efeito não é observado em mesma intensidade quando as células foram expostas à isoforma mutada LiRecDT1/H12A, com atividade catalítica residual (B) Reorganização da membrana plasmática e agregação de *lipid rafts* após exposição eritrócitos humanos à 25 µg/mL de veneno total de *L. intermedia* e LiRecDT1 por 4 horas. É possível verificar que, uma vez expostas ao veneno total e à LiRecDT1, pontos fluorescentes (setas) foram observados, caracterizando a agregação de *lipid rafts.* Em ambos os experimentos, as lipid rafts foram visualizadas pelo uso do kit *Vybrant Alexa Fluor 594 Lipid Raft Labeling Kit*, que evidencia *lipid rafts* que contém gangliosídeos GM1. Adaptado de Chaim e colaboradores (2008) e Chaves-Moreira e colaboradores (2009).

Desta forma, é possível sugerir que, ao interagir com a membrana de células, a fosfolipase-D pode iniciar eventos que levam à sua internalização, e uma vez dentro das células, a toxina pode iniciar processos inflamatórios. Sendo assim, o estudo da interação da fosfolipase-D de *L. intermedia* com a membrana de células endoteliais de aorta de coelho e sua associação com processos inflamatórios se faz necessário para elucidar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da dermonecrose após acidentes com aranhas deste gênero. Além disso, a compreensão de tais mecanismos pode levar à identificação de vias de sinalização envolvidas no processo de inflamatório e identificação de

possíveis alvos de inibidores, permitindo a possível estabilização ou reversão do processo de desenvolvimento da dermonecrose.

3.0 JUSTIFICATIVA

Os principais efeitos observados no loxoscelismo e as moléculas presumidamente envolvidas nos eventos fisiopatológicos e citotóxicos têm sido identificados e descritos em muitos trabalhos utilizando o veneno total (LUCIANO *et al.*, 2004). Mais recentemente, por meio técnicas de clonagem e expressão heteróloga de toxinas recombinantes, diferentes isoformas das fosfolipases-D também contribuíram para o entendimento do loxoscelismo. Em especial, a primeira isoforma recombinante obtida de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT1) foi capaz de causar dermonecrose em pele de coelho, hemólise direta *in vitro* e nefrotoxicidade direta (sem a presença de infiltrado inflamatório nos rins), tanto em *in vivo* em camundongos, quanto *in vitro* em cultura de células epiteliais tubulares (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). Uma isoforma recombinante com uma mutação sítio-dirigida no sítio catalítico (LiRecDT H12A) é modelo adicional para o entendimento do papel da atividade enzimática e interação com alvos/substratos celulares (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011).

As células endoteliais são de grande importância para o entendimento de processos inflamatórios, visto que estão entre os primeiros tipos celulares a entrar em contato com patógenos e moléculas endógenas bioreativas (OPITZ *et al.*, 2009). Além disso, 30% da superfície dessas células é ocupada por caveola (PARTON e RICHARDS, 2003), fornecendo um modelo de estudo para vias de internalização.

Os eventos inflamatórios promovidos pelo veneno total e pela toxina dermonecrótica têm sido estudados utilizando células endoteliais (NOWATZKI *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011a; NOWATZKI *et al.*, 2012). Entretanto, as bases

moleculares envolvidas nesses eventos ainda são elusivas e escassas, como vias de sinalização que levam à expressão de selectinas ou VCAM-1. Os mediadores lipídicos e outros elementos inflamatórios induzidos pela atividade fosfolipásica sobre as células têm sido identificados (BARBARO *et al.*, 2010; LAJOIE *et al.*, 2013), porém todos os eventos locais e sistêmicos provocados por essas moléculas ainda não são completamente compreendidos.

A prospecção de um tratamento eficaz para os acidentes loxoscélicos depende da ampla compreensão dos processos promovidos pelas toxinas do veneno e dos compostos bioativos formados. A identificação e caracterização das principais vias de sinalização ativadas pela exposição ao veneno e a fosfolipases-D contribuirá para determinação de moléculas envolvidas em eventos inflamatórios e sua possível inibição. Adicionalmente, esse conhecimento pode ser utilizado no desenvolvimento de novas drogas, testes diagnósticos e outras práticas biotecnológicas e industriais.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Compreender a dinâmica dos mecanismos moleculares da ação do veneno e da toxina dermonecrótica (fosfolipase-D) de *Loxosceles intermedia* após interação com as membranas de células endoteliais.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar a relação da citotoxicidade do veneno e das fosfolipases-D recombinantes considerando a interação com componentes da membrana plasmática de células endoteliais;
- Verificar em células endoteliais as alterações morfológicas nas membranas resultantes da interação com o veneno e com as fosfolipases-D recombinantes de forma tempo-dependente;
- Verificar a possível internalização e subsequente endereçamento da fosfolipase-D recombinante após interação com a membrana plasmática de células endoteliais de forma tempo-dependente;
- Verificar as alterações bioquímicas no conteúdo das membranas resultantes da interação com o veneno total e com as fosfolipases-D recombinantes em células endoteliais.

5.0 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Extração do veneno

O veneno total de *L. intermedia* foi obtido de aranhas adultas capturadas do ambiente e mantidas em condições apropriadas (água *ad libitum* e temperatura ambiente) e submetidas a eletrochoque de 15 volts no cefalotórax, conforme descrito por Feitosa e colaboradores (1998). Posteriormente, o veneno foi avaliado quanto ao conteúdo proteico por microensaio adaptado de Bradford (1976) e mantido a -80°C até o uso.

5.2 Transformação das construções em *E. coli* BL21(DE3)pLysS

As construções em vetor de expressão pET-14b da toxina dermonecrótica (LiRecDT1), da isoforma fusionada à proteína fluorescente GFP (LiRecDT1/GFP), e da isoforma com mutação sítio dirigida com atividade enzimática residual (LiRecDT1/H12A) produzidas por Chaim e colaboradores (2006, 2011a) e Chaves-Moreira e colaboradores (2009) foram obtidas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos do Departamento de Biologia Celular.

Previamente à expressão das toxinas recombinantes, as construções foram transformadas por eletroporação em cepa bacteriana eletrocompetente BL21(DE3)pLysS. Após a transformação, as bactérias foram ressuspensas em meio SOC (triptona 20g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 0,5g/L; KCl 2,5mM; MgCl2 10mM; $MgSO_4$ 10mM; glicose 0,2M) e incubadas a 37°C por 1 hora, constituindo a fase de recuperação. Em seguida, foi realizado o plaqueamento das bactérias em duas placas constituídas de meio LB ágar (triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L; ágar-ágar 15g/L), ampicilina (100µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL), sendo a primeira placa referente a uma fração de 100µL da solução contendo as bactérias transformadas, e a segunda placa referente a 900µL. O plaqueamento foi realizado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Protocolo adaptado de Chaves-Moreira e colaboradores (2009) e Chaim e colaboradores (2011a).

5.3 Expressão e purificação das 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 12mL de meio LB-líquido (triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L), ampicilina (100µg/mL) e cloranfenicol (34µg/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 $D.O._{600}$=0,5, a indução da expressão das proteínas recombinantes foi realizada utilizando 0,05mM de β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) a 30°C por 3,5 horas. Foram coletadas amostras nos tempos inicial (T0h) e final (T3,5h) de expressão, as quais foram centrifugadas por 3 minutos a 4000xG. A fração solúvel de cada amostra foi descartada e o precipitado resultante foi congelado a 20°C. Após o tempo de expressão, as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo e centrifugadas por 7 minutos a 7000xG. O precipitado foi ressuspendido em tampão de ligação (NaH_2PO_4 50mM pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 10mM) e cada amostra foi incubada com lisozima 1mg/mL por 30 minutos a 4°C. Após, as amostras foram submetidas a lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos de 1000psi cada) e então centrifugadas a 14000xG 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_2PO_4 50mM pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 10mM) por 1 hora a 4°C sob agitação de 6rpm. Em seguida, foram realizadas sucessivas lavagens com tampão de lavagem (NaH_2PO_4 50mM pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 20mM). A proteína recombinante foi eluída com tampão de (NaH_2PO_4 50mM pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 250mM). Protocolo adaptado de Chaim e colaboradores (2011a), Kusma e colaboradores (2008), e Chaves-Moreira e colaboradores (2009).

5.4 Análise da expressão das fosfolipases-D recombinantes por SDS-PAGE

A fim de analisar os resultados das expressões da LiRecDT1, LiRecDT1/GFP, e LiRecDT1/H12A, foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida 10% contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras (contendo 5% de β-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 25mA constante, até a separação total das mesmas.

Após a eletroforese, os géis foram fixados em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12%, formalina 0,05%) por 2 horas. Em seguida, foram realizadas três lavagens com etanol 35% por 20 minutos cada, e os géis foram incubados com solução sensibilizadora contendo tiossulfato de sódio 0,02% por 5 minutos. Após três lavagens rápidas com água mili-Q, os géis foram expostos à solução de coloração de prata ($AgNO_3$ 0,2%, formalina 0,07%) por 20 minutos. Os géis foram novamente submetidos à lavagem com água mili-Q, e então a marcação com prata foi observada após incubação com solução reveladora (Na_2CO_3 6%, formalina 0,05%, $Na_2S_2O_3$ 0,0004%) até as bandas serem visualizadas. Os géis foram então incubados com solução contendo metanol 50% e formalina 12% por 5 minutos, visando o término da revelação. Por fim, os géis foram observados sob luz branca e fotodocumentados em *scanner* HP Deskjet F4180. Protocolo adaptado de Chaim e colaboradores (2011a) e Chaves-Moreira e colaboradores (2009).

5.5 Ensaios de caracterização bioquímica e funcional de fosfolipases

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, OR, EUA), um reagente fluorogênico sensível para H_2O_2. Cada toxina foi incubada (10µg) 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_20_2. Finalmente, a H_2O_2 na presença da peroxidase reage com o *Amplex red* estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o Resorufin. As reações foram realizadas em pentaplicatas, sendo as amostras incubadas a 37ºC por 1 hora. Em seguida, a fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro (M200 Infinite - TECAN) usando comprimento de onda de excitação em 560nm e emissão em 590nm. O protocolo foi adaptado de Chaim e colaboradores (2011a).

5.6 Marcação da LiRecDT1 com o fluoróforo BODIPY®FL

Com o intuito de obter a LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A marcadas com fluoróforos para a observação da possível interação das toxinas com estruturas celulares por microscopia confocal, as toxinas recombinantes foram conjugadas com o reagente BODIPY®FL, o qual é um marcador fluorescente amino-reativo, seguindo as recomentações do fornecedor (ThermoFisher-Scientific, Waltham, MA, EUA). Primeiramente, a LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A (2mg/mL) foram incubadas com bicarbonato de sódio (100mM). Em seguida, 100µL do reagente BODIPY previamente solubilizado em DMSO (10mg/mL) foi adicionado à solução contendo a toxina recombinante, e a mistura foi incubada por 1 hora a 4°C. Em seguida, as toxinas foram submetidas à cromatografia de gel filtração em colunas PD-Midiprep G-10 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) visando a separação de fluoróforos livres em relação às toxinas marcadas. Por fim, as toxinas foram concentradas em filtros Amicon (EMD Milipore, Billerica, MA, USA) com *cut-off* de 10 kDa e alocadas a 4°C.

5.7 Cultivo celular

O modelo de estudo escolhido para o projeto foi a linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (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 (14mM), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), antibiótico (100IU/mL de penicilina) e antimicótico (100ug/mL de estreptomicina) provenientes da Sigma (Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em estufa a 37°C com uma atmosfera úmida, sob tensão de 5%.

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 colagenases, 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, placas de Petri ou placas *multiwell* de 24 poços provenientes da Kasvi (Curitiba, PR, Brasil), dependendo do ensaio. 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 Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em meio F12).

Para a avaliação das alterações morfológicas decorrentes da exposição das células à LiRecDT1, 10.000 células foram plaqueadas em placas de 24 *wells* e mantidas em meio F12 por 48 horas. Após, foi realizada a substituição do meio anterior por meio F12 não suplementado com SFB (privação de nutrientes) e após 16 horas, as células foram incubadas com 50µg/ml da LiRecDT1 e do veneno total de *L. intermedia*, em um total de 300µl de meio F12 por poço, por um período de 24 horas. As alterações morfológicas foram visualizadas e

capturadas em microscópio invertido equipado com sistema de contraste de fase acoplado à câmera digital Sony Cyber-shot DSC- W35.

Para as avaliação da interação da LiRecDT1/GFP com a membrana plasmática e possível endereçamento para o sistema endossomo/lisossomo das células da linhagem RAEC, 10.000 células foram plaqueadas em lamínulas de vidro redondas com diâmetro de 13mm alocadas em placas de 24 *wells* e mantidas em meio F12 por 48 horas. Após, foi realizada a substituição do meio anterior por meio F12 não suplementado com SFB (privação de nutrientes) e após 16 horas, as células foram incubadas com 50µg/ml da LiRecDT1/GFP por um período de 30 minutos, 1 hora e 4 horas. A interação da toxina recombinante com as estruturas celulares foi visualizada em microscópio confocal Leica TCS SP8, equipado com uma objetiva Plan-Apochromat 63x com óleo de imersão.

Ainda, uma segunda avaliação da interação da LiRecDT1/GFP com a membrana plasmática de células da linhagem RAEC foi realizada, onde 30.000 células foram plaqueadas em placa TC35mm com fundo de vidro e cultivadas sob as mesmas condições supracitadas. Após 16 horas na presença de meio F12 não suplementado com SFB, as células foram resfriadas a 4°C e então incubadas por 10 minutos com 2mg/mL do reagente Vybrant® Alexa Fluor® 594 Lipid Raft Labeling Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para a marcação de microdomínios de membrana, o qual se baseia na alta afinidade da subunidade-B da toxina colérica (CT-B) por Monossialogangliosídeo (GM1), presentes em grandes quantidade em regiões de *lipid rafts*. Em seguida, as células foram lavadas com EBSS e então incubadas com 50µg/ml da LiRecDT1/GFP por um período máximo de 4 horas a 37°C. A interação da toxina recombinante com a membrana plasmática foi visualizada em microscópio Leica DMi8 equipado com sistema TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*).

Para a avaliação da interação da LiRecDT1/GFP com componentes da membrana plasmática com maior detalhamento, 100.000 células foram plaqueadas em lamínulas de vidro redondas de alta precisão com diâmetro de 18mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konigshofen, Alemanha) alocadas em placas de 6 *wells* e mantidas em meio F12 por 48 horas. Após, foi realizada a substituição do meio anterior por meio F12 não suplementado com SFB (privação de nutrientes) e após 16 horas, as células foram incubadas com 50µg/ml da LiRecDT1/GFP por um período de 4 horas. A interação da toxina

recombinante com componentes da membrana plasmática foi visualizada em microscópio de super-resolução Leica SR GSD e as imagens foram analisadas utilizando o software Leica LAS AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

As imagens obtidas pela microscopia de fluorescência confocal, TIRF e GSD foram analisadas no software livre ImageJ. É importante ressaltar que a construção das imagens em relação a brilho e contraste foi realizada sem o auxílio de programas de edição de imagens.

5.8 Reações de imunomarcação para Microscopia de Fluorescência Confocal

Após o cultivo das células e exposição à LiRecDT1/GFP, as células foram lavadas com tampão EBSS três vezes, fixadas com paraformaldeído 2% por 30 minutos e então incubadas com glicina 0,1M por 10 minutos, sendo todas as reações incubadas a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com PBS/BSA 1% + Triton X-100 0,1% por 15 minutos para a permeabilização da membrana plasmática. Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários na presença de BSA 1% + Triton X-100 0,1%, por 1 hora a 4°C. Para a detecção da LiRecDT1/GFP, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-GFP produzido em cabras (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). Para a detecção da proteína caveolina-1, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-caveolina-1 produzido em coelhos (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Para a detecção das proteínas LAMP1 e LAMP2, foram utilizados os anticorpos policlonais anti-LAMP1 e anti-LAMP2 produzidos em coelhos (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS, e então foi realizada a reação com os anticorpos secundários na presença de BSA 1% + Triton X-100 0,1%, por 40 minutos a 4°C. Foram utilizados os anticorpos policlonais anti-cabra conjugado com Alexa Fluor® 647 (1:250, Molecular Probes) para a detecção da LiRecDT1/GFP, e anti-coelho conjugado com Alexa Fluor® 488 (1:250, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para detecção das proteínas caveolina-1, LAMP1 e LAMP2. Após a incubação com os anticorpos secundários, as amostras foram lavadas novamente com PBS, e então o reagente DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydro-chloride) foi utilizado para a detecção dos núcleos das

células, sendo a incubação por 10 minutos a 4°C (1:10.000, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Por fim, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro para microscopia com o auxílio do meio de montagem Fluoromount-G.

5.9 Reações de imunomarcação para Microscopia de Super-resolução (SR-GSD)

Após o cultivo das células e exposição à LiRecDT1/GFP, as células foram lavadas com tampão EBSS três vezes e fixadas em dois passos. Inicialmente as células foram incubadas com glutaraldeído 0,3% diluído em PBS e saponina 0,01% diluída em tampão A (EGTA 5mM, $MgCl_2$ 5mM, glicose 5mM, MES 10mM e NaCl 150mM) por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas com tampão A contendo glutaraldeído 0,5% por 10 minutos. As amostras foram tratadas com $NaBH_4$ 0,1% em PBS por 7 minutos, lavadas com PBS e incubadas com solução de bloqueio (BSA 5% em PBS) por 1 hora. Estas reações ocorreram a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as amostras foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-GFP produzido em cabras (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e com o anticorpo policlonal anti-caveolina-1 produzido em coelhos (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), por 16 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com os anticorpos secundários policlonais anti-cabra conjugado com Alexa Fluor® 647 (1:250, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para a detecção da LiRecDT1/GFP, e anti-coelho conjugado com Alexa Fluor® 488 (1:250, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para a detecção da proteína caveolina-1. Por fim, as lâmínulas foram montadas em lâminas de vidro com depressão central embebidas em meio contendo β-mercapto-etilamina 70mM diluída em PBS, pH 7,4.

5.10 Isolamento de *lipid rafts* das células RAEC por ultracentrifugação em gradiente de sacarose e análise por western-blotting

Para o isolamento de *lipid rafts* de células da linhagem RAEC, estas foram primeiramente desaderidas das garrafas de cultivo através da incubação com solução de pancreatina diluída em EBSS (0,25% massa/volume), como descrito

no item 5.7 de Materiais e Métodos. Após, a suspensão de células foi diluída em meio F12 contendo 10% de SFB, para inibir a ação enzimática e então as células foram então coletadas por centrifugação (1500xG por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspendido com tampão de lise TNE (NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM pH 7.5, EDTA 5mM e Triton X-100 1% acrescido de iodoacetamida 10mM, 1,10-fenantrolina 10mM, e benzamidina 10mM), submetido a sonicação (10 ciclos de 10 segundos a 50% de potência). Em seguida, o lisado foi incubado por 30 minutos a 4°C e, então, centrifugado por 5 minutos a 500xG a 4°C. Por fim, 715µL do lisado foi adicionado a um tubo de ultracentrifuga contendo 1285µL de solução de sacarose 70% diluída em tampão TNE. Sobre o lisado montou-se um gradiente de sacarose com 4mL de solução de sacarose 35% e mais 4mL de solução de sacarose 5%, resultando em um gradiente final de 45-35-5%. Cada amostra foi submetida à ultracentrifugação em centrífuga Optima XE-100 Ultracentrifuge (Beckman-Coulter, Brea, CA, EUA) a 39000rpm (Rotor SW 41 Ti) por 18 horas a 4°C. Após a centrifugação, 12 frações de 800µl cada foram retiradas do topo até o fundo do tubo. O conteúdo proteico de cada amostra foi precipitado por meio da adição de 200µL de ácido tricloroacético 50% e incubação por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20000xG por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido. Foi realizada uma lavagem com 1mL de água mili-Q seguida de uma centrifugação a 20000xG por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados resultantes ressuspendidos em 120µL de tampão para corrida em SDS-PAGE (Tris 50mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, e 2,5% β-mercaptoetanol). Protocolo adaptado de Bae e colaboradores (2007) e Graziani e colaboradores (2004).

Visando a identificação das frações contendo as proteínas caveolina-1 e flotilina-1 (marcadores clássicos de *lipid rafts*), as amostras anteriores foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% como descrito no item 5.4 de Materiais e Métodos. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 15 minutos sob tensão de 15V. Em seguida as membranas foram bloqueadas por 2 horas com caseína 5% diluída em tampão TBS-T (Tris 20mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,05%). Em seguida, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários anti-caveolina-1 (1:1000) e anti-flotilina-1 (1:1000) (Cusabio, Hubei, China) por 16

horas a 4°C. Por fim, após 3 lavagens com tampão TBS-T, as membranas foram inubadas com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com peroxidase por 1 hora, e então reveladas com o substrato para quimioluminescência SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo-Scientific, Waltham, MA, EUA). As bandas de interesse foram visualizadas com o auxílio do equipamento Amershan Imager 600 (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) (TOWBIN et al. 1979; HARLOW e LANE, 1988).

5.11 Análise da composição lipídica de frações enriquecidas em *lipid rafts* por cromatografia de alta performance em camada delgada (HPTLC)

Após o fracionamento do extrato celular referente ao grupo controle (sem tratamento com toxinas) em gradiente de sacarose e precipitação com TCA e subsequentes lavagens, as frações enriquecidas em *lipid rafts* (*pool* das frações 4, 5 e 6) e as frações não enriquecidas em *lipid rafts* (*pool* das frações 9, 10 e 11) foram liofilizadas e alocadas a -20°C. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas com 100 µL de cloforfórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e analisadas por cromatografia de alta performance em camada delgada. O ensaio foi realizado em placas de silica gel 60 utilizando uma mistura de clorofórmio:metanol:metilamina (65:35:10 v/v/v) como fase móvel. As amostras referentes às frações obtidas anteriormente foram aplicadas (20 µL) sobre a sílica e posteriormente visualizadas por colorações específicas para cada cada classe lipídica avaliada. As análises por HPTLC foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Sérgio de Toledo, na Universidade Paulista de Medicina – São Paulo.

Para a visualização de esteróis, as placas foram submetidas ao breve borrifamento com com o reagente de sulfato de cobre (10% $CuSO_4$, 5 H_2O em 3% de H_2SO_4). Os esteróis foram visualizados como manchas marrons após o aquecimento das placas a 120°C por 5 minutos. Protocolo adaptado de Yoneyama e colaboradores (2006).

Para a visualização dos fosfolipídeos, as placas foram submetidas ao breve borrifamento com o reagente *Molibdenium blue* (Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os fosfolipídeos foram visualizados como manchas

azuis cerca de 10 minutos após coloração. Protocolo adaptado de Toledo e colaboradores (1995) e Yoneyama e colaboradores (2006).

Para visualização dos glicoesfingolipídeos as placas foram primeiramente borrifadas com primulina 0,01% e os lipídeos visualizados sob luz UV. Em uma segunda etapa, os glicoesfingolipídeos foram visualizados como manchas púrpuras por coloração com orcinol/H_2SO_4, após aquecimento das placas a 120°C por 5 minutos. Protocolo adaptado de Straus e colaboradores (1993).

6.0 Resultados

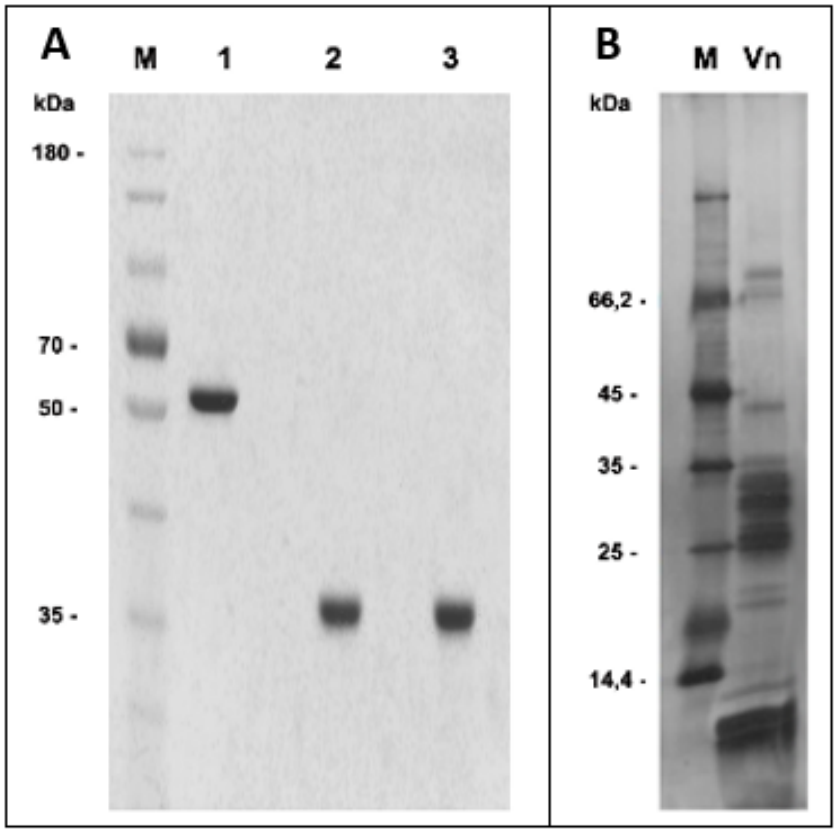
6.1 Obtenção do veneno e das toxinas recombinantes e verificação da citotoxicidade sobre células RAEC

Com o intuito de investigar os efeitos do veneno, da LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A sobre as células endoteliais da linhagem RAEC em condições *in vitro*, primeiramente as toxinas foram obtidas após expressão em *E. coli* e purificação. Buscou-se, em seguida, verificar a atividade esfingomielinásica do veneno e das toxinas recombinantes a fim de determinar a viabilidade de seu uso como ferramentas nos experimentos com as células. Uma vez que o veneno e as toxinas foram obtidos e suas atividades determinadas, as alterações morfológicas promovidas pelos mesmos sobre as células RAEC foi investigada durante intervalos de tempo até o período de 24 horas.

6.1.1 Obtenção das toxinas recombinantes do tipo fosfolipase-D: isoformas LiRecDT1, LiRecDT1/GFP e LiRecDT1/H12A

A partir das construções disponíveis no laboratório, foram realizadas as expressões de ambas as isoformas da fosfolipase-D em cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Após a expressão e subsequente purificação das toxinas, foi possível observar que as três isoformas expressas e purificadas foram obtidas com alto grau de pureza, uma vez que a análise por SDS-PAGE sob condições redutoras revelou bandas com massa molecular aproximada de 60 kDa relativa à LiRecDT1/GFP e 35 kDa relativas à LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A. Ainda, o perfil eletroforético do veneno de *L. intermedia* obtido após a extração por eletrochoque foi obtido por SDS-PAGE gradiente 10-20%, a fim de confirmar a integridade do veneno para uso experimental (Figura 8).

FIGURA 8 – EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES E DO PERFIL DO VENENO DE *L. INTERMEDIA* POR SDS/PAGE.

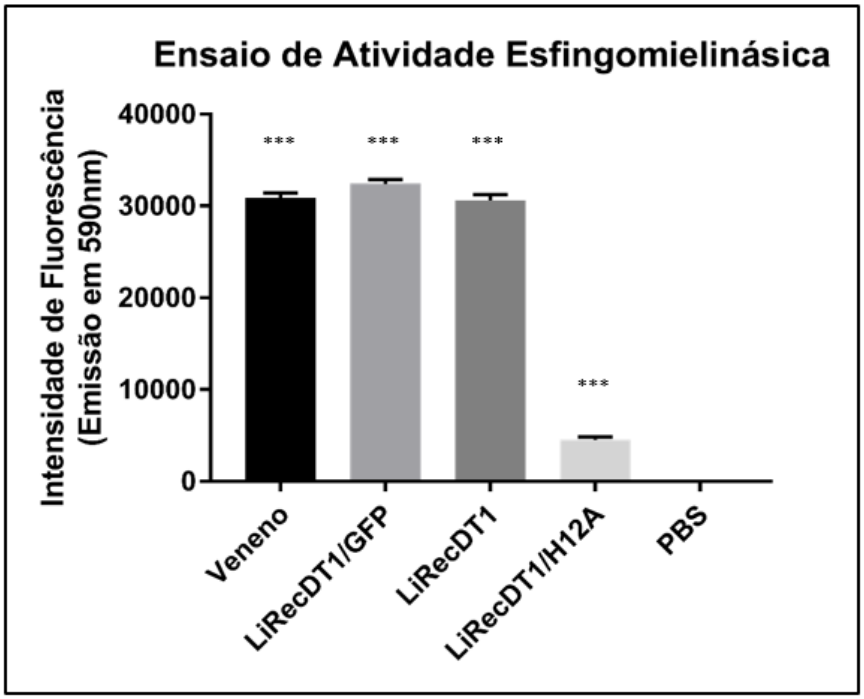


(A) SDS-PAGE 10% redutor mostrando as amostras (1 µg) relativas às frações solúveis e purificadas por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA Agarose após a expressão em cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. A LiRecDT1/GFP (banda com massa molecular aproximada de 60 kDa) está representada em "1". A LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A (bandas com massa molecular aproximada de 35 kDa) estão representadas em "2" e "3", respectivamente. (B) SDS-PAGE gradiente 10-20% redutor mostrando o perfil do veneno de *L. intermedia* (5µg) analisado após a extração por eletrochoque, representado por "Vn". Os marcadores de massa molecular estão representados por "M".

6.1.2 Atividade enzimática da LiRecDT1, LiRecDT1/GFP e LiRecDT1/H12A

Após a expressão das toxinas recombinantes, as proteínas purificadas foram avaliadas frente à sua atividade esfingomielinásica utilizando o kit para detecção indireta da liberação de colina Amplex Red. Após a reação, os dados obtidos da leitura espectrofluorimétrica demonstraram que ambas a LiRecDT1/GFP e LiRecDT1 hidrolisam a esfingomielina, e que a LiRecDT1/H12A possui atividade residual (Figura 9), de modo que estes dados corroboram os resultados obtidos por Chaim e colaboradores (2011a).

FIGURA 9 – ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DA LIRECDT1, LIRECDT1/GFP E LIRECDT1/H12A.



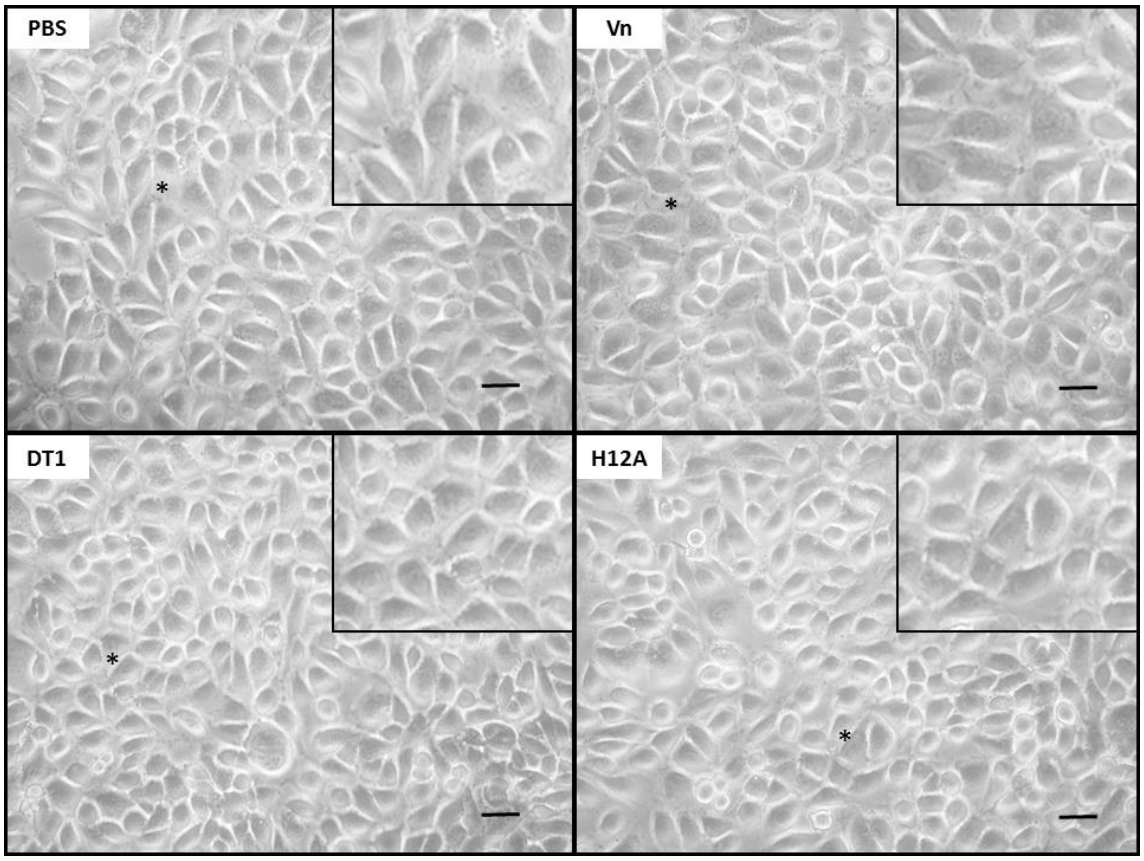
A atividade enzimática do veneno e das fosfolipases-D recombinantes purificadas foi avaliada utilizando o kit para detecção indireta da liberação de colina Amplex Red. Os ensaios se deram a 37°C por 1 hora. Como controle de reação foi utilizado PBS na ausência de qualquer toxina. A fluorescência decorrente do produto da reação foi determinado por espectrofluorimetria com excitação em 560nm e emissão em 590nm. O ensaio foi realizado em triplicata utilizando 10 µg de toxina. Os asteriscos indicam a significância quando comparada ao grupo controle ($p<0,001$).

É importante ressaltar que para cada expressão das toxinas recombinantes é realizado um novo ensaio de atividade esfingomielinásica. Ainda, a verificação da atividade enzimática do veneno e das toxinas recombinantes foi realizada em triplicatas para cada experimento, em três experimentos independentes. Estes resultados, por sua vez, permitem a utilização da LiRecDT1/GFP e da LiRecDT1 como a enzima dermonecrótica ativa, desta forma, possibilitando a avaliação da sua interação com a membrana plasmática e/ou outras estruturas de células cultivadas *in vitro*. Ainda, o fato da LiRecDT1/H12A possuir atividade residual permite sua utilização como controle negativo para atividade fosfolipásica e seus respectivos efeitos sobre a membrana de células cultivadas *in vitro.*

6.1.3 Alterações morfológicas causadas pelo veneno e pela LiRecDT1 em células RAEC por microscopia de contraste de fase

Tendo em vista a confirmação da atividade esfingomielinásica do veneno e da LiRecDT1, o passo seguinte constituiu na avaliação das alterações morfológicas causadas pela mesma células RAEC. As primeiras observações foram realizadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido. As análises foram realizadas em triplicatas para cada experimento, em um total de três experimentos independentes. Após a exposição das células às toxinas, veneno de *L. intermedia*, ou PBS, as mesmas foram observadas no tempo inicial de exposição e nos intervalos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas. Em comparação ao grupo controle, as células observadas no tempo inicial de exposição à toxina recombinante ou veneno não apresentaram alterações morfológicas (Figura 10).

FIGURA 10 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC LOGO APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

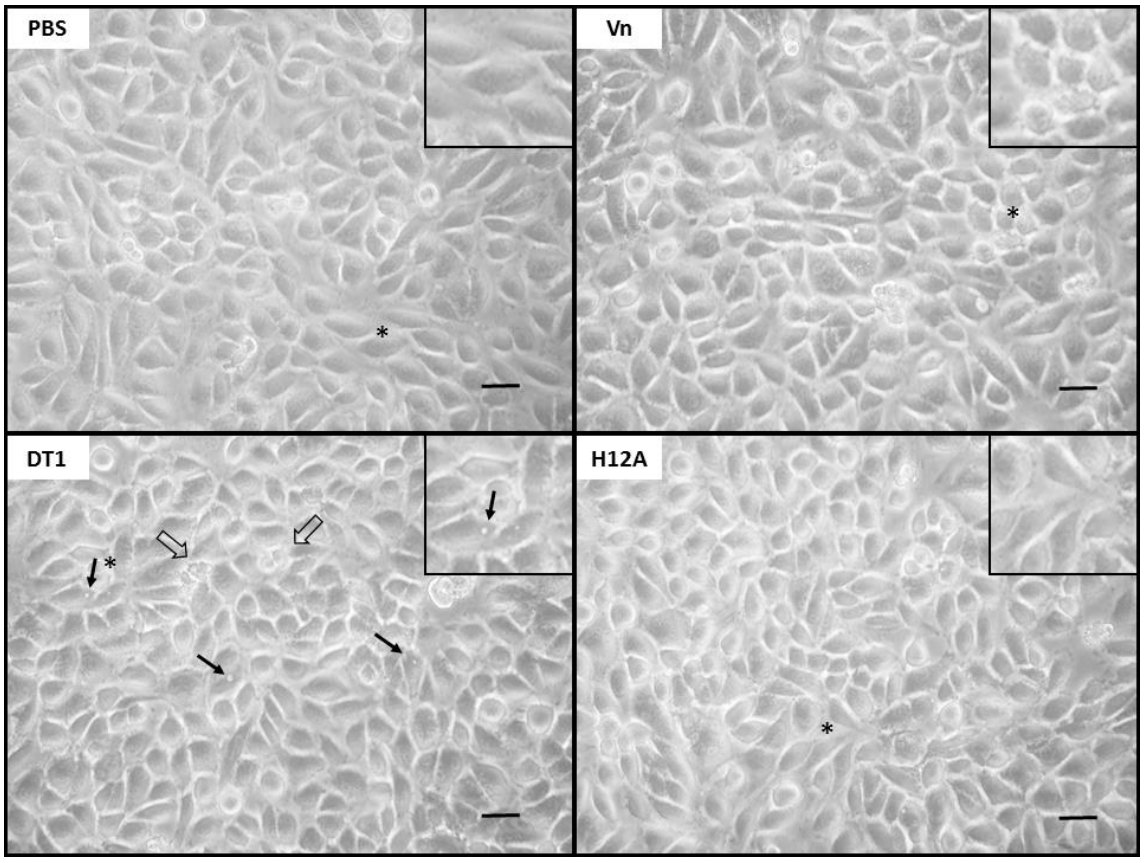


Células RAEC foram expostas à PBS, veneno de *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, e observadas logo após a incubação. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às toxinas e ao veneno em comparaçao com as células expostas à PBS. Os asteriscos representam a àrea ampliada nos insertos. As barras representam 50µm. Células observadas com objetiva de 20x, com aumento digital da câmera de 2,6x, caracterizando aumento final de 520x.

Após 1 hora de exposição ao veneno de *L. intermedia* foi possível observar que várias células apresentaram morfologia arredondada, caracterizando o início da desadesão à matriz extracelular (Figura 11 - Vn). Este resultado está de acordo com dados obtidos por outros autores, uma vez que o veneno, além das fosfolipases-D, possui também metaloproteases e serinoproteases, moléculas que hidrolisam proteínas que compõem a matriz extracelular, levando à desadesão celular (VEIGA *et al.*, 2000b). Neste mesmo intervalo de tempo, não foi possível observar alterações morfológicas significativas ao comparar as células expostas à LiRecDT1 H12A, sendo que as mesmas apresentaram morfologia semelhante ao controle negativo incubado com PBS. Contudo, algumas células expostas à LiRecDT1 apresentam vacuolização citoplasmática e morfologia arredondada, caracterizando sinais de

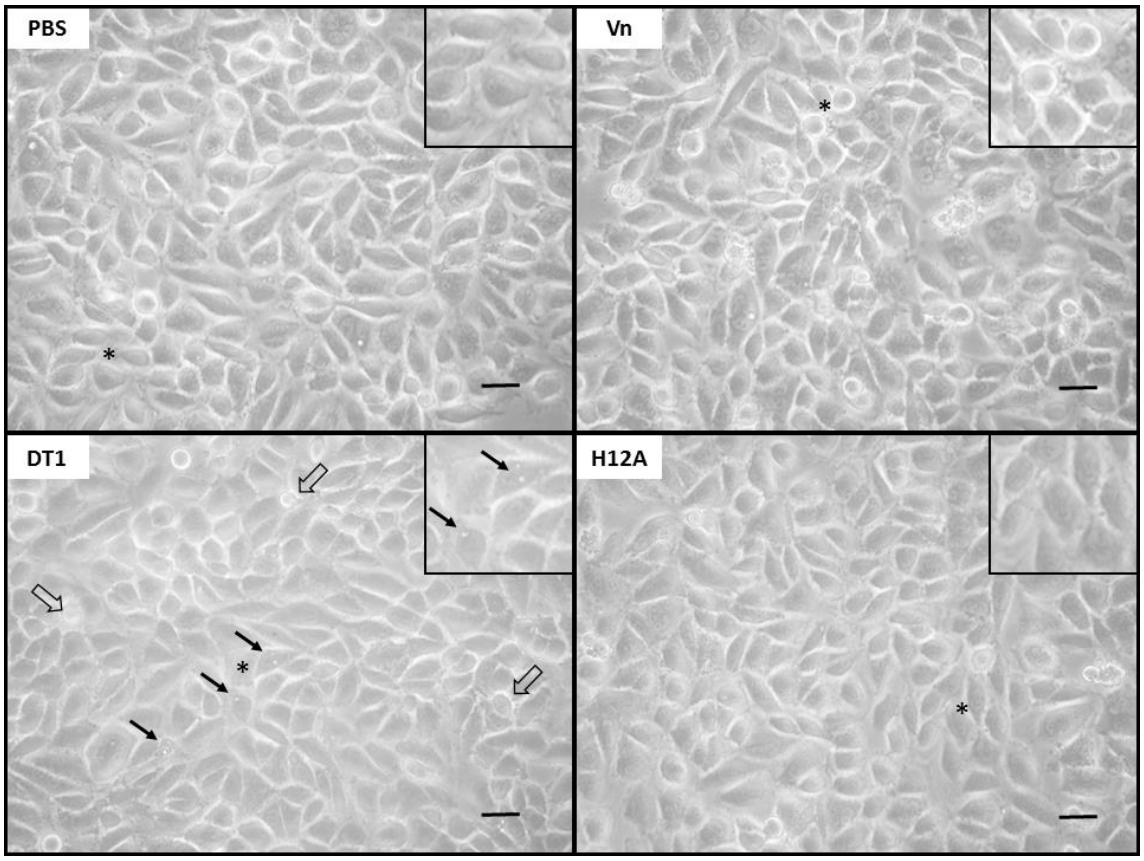
citotoxicidade (Figura 11 – DT1). Efeitos semelhantes foram observados no intervalo de 2 horas após a exposição às toxinas e veneno sob as mesmas condições (Figura 12).

FIGURA 11 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 1 HORA APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.



Células RAEC foram expostas à PBS, veneno de *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, e observadas após 1 hora. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às LiRecDT1 H12A em comparaçao com as células expostas à PBS, contudo, as células expostas à LiRecDT1 apresentaram vacuolização citoplasmática (setas preenchidas) e morfologia arredondada (setas sem preenchimento). As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram-se com morfologia arredondada, indicando desadesão da matriz extracelular. Os asteriscos representam a àrea ampliada nos insertos. As barras representam 50µm. Células observadas com objetiva de 20x, com aumento digital da câmera de 2,6x, caracterizando aumento final de 520x.

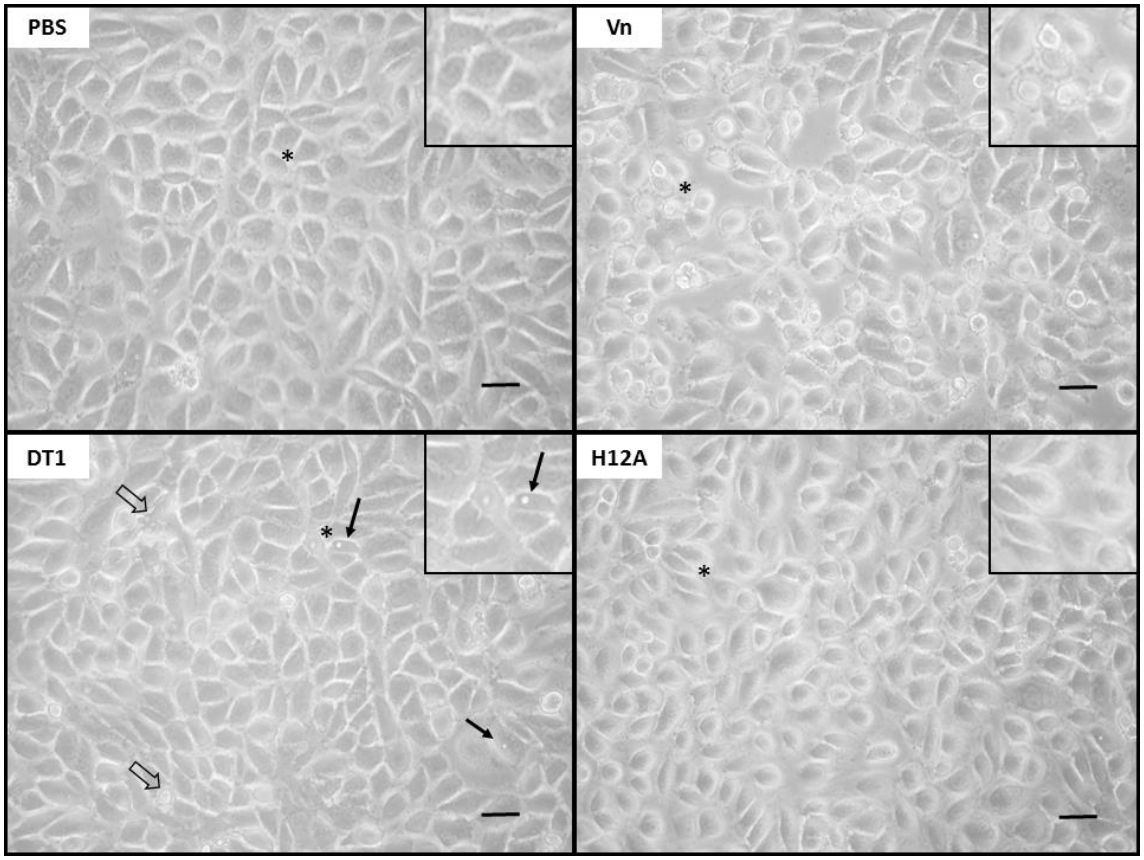
FIGURA 12 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 2 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.



Células RAEC foram expostas à PBS, veneno de *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, e observadas após 2 horas. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às LiRecDT1 H12A em comparaçao com as células expostas à PBS, contudo, as células expostas à LiRecDT1 apresentaram vacuolização citoplasmática (setas preenchidas) e morfologia arredondada (setas sem preenchimento). As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram-se com morfologia arredondada, indicando desadesão da matriz extracelular. Os asteriscos representam a àrea ampliada nos insertos. As barras representam 50µm. Células observadas com objetiva de 20x, com aumento digital da câmera de 2,6x, caracterizando aumento final de 520x.

Após 4 horas, as células expostas ao veneno de *L. intermedia* se apresentaram desaderidas da matriz extracelular, uma vez que o aspecto morfológico das células era arredondado e com o volume reduzido, evidenciando alterações morfológicas características de desadesão ao substrato (Figura 13 - Vn). Ao comparar as células expostas à LiRecDT1 com o controle negativo incubado com PBS, foi possível observar a presença de células com a morfologia arredondada e formação de vacúolos citoplasmáticos (Figura 13 – DT1). Contrariamente, os mesmos efeitos não foram observados nas células expostas à LiRecDT1 H12A.

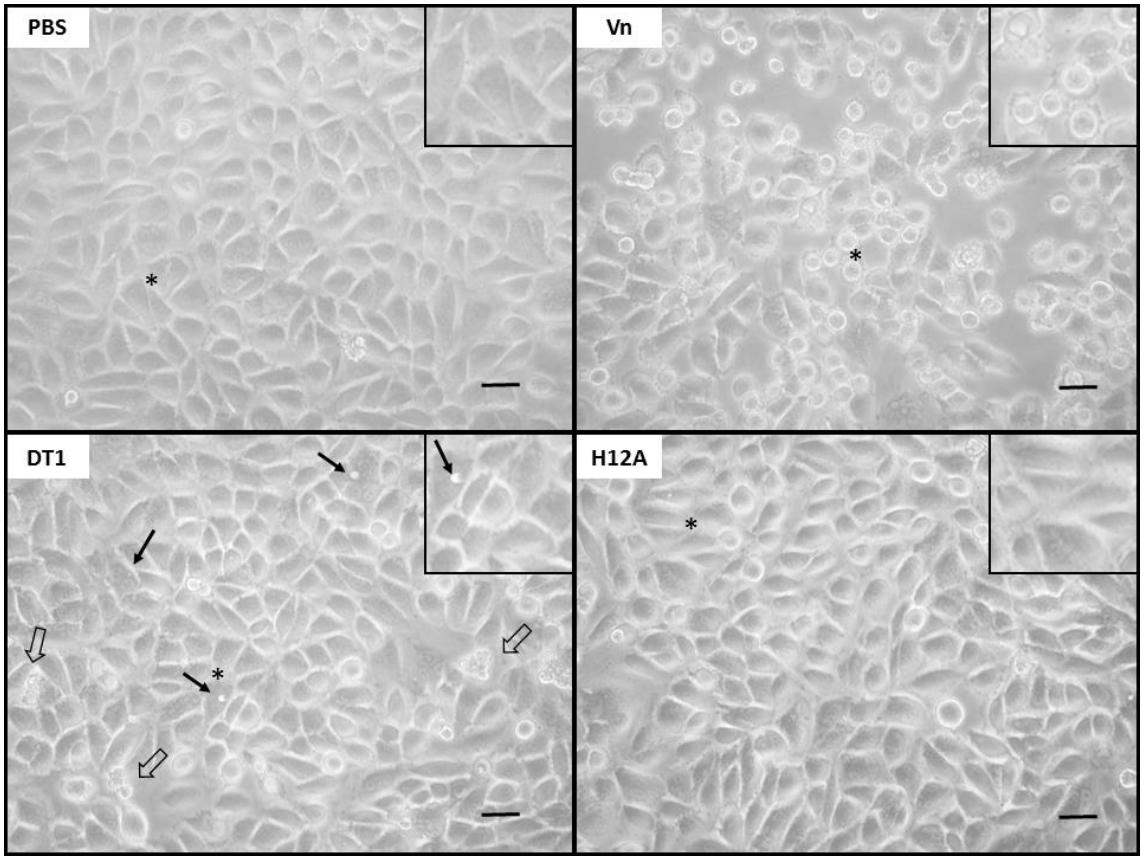
FIGURA 13 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 4 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.



Células RAEC foram expostas à PBS, veneno de *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, e observadas após 4 horas. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às LiRecDT1 H12A em comparaçao com as células expostas à PBS, contudo, as células expostas à LiRecDT1 apresentaram vacuolização citoplasmática (setas preenchidas) e morfologia arredondada (setas sem preenchimento). As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram-se com morfologia arredondada, indicando desadesão da matriz extracelular. Os asteriscos representam a àrea ampliada nos insertos. As barras representam 50µm. Células observadas com objetiva de 20x, com aumento digital da câmera de 2,6x, caracterizando aumento final de 520x.

Após 6 horas, as células expostas ao veneno se apresentaram, em sua maioria, desaderidas da matriz extracelular (Figura 14 - Vn). As células expostas à LiRecDT1, assim como no intervalo de 4 horas, também possuíam aspecto arredondado e vacuolização (Figura 14 – DT1). Novamente, não foram observadas alterações na morfologia das células expostas à LiRecDT1 H12A quando comparadas com o controle negativo incubado com PBS.

FIGURA 14 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 6 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.

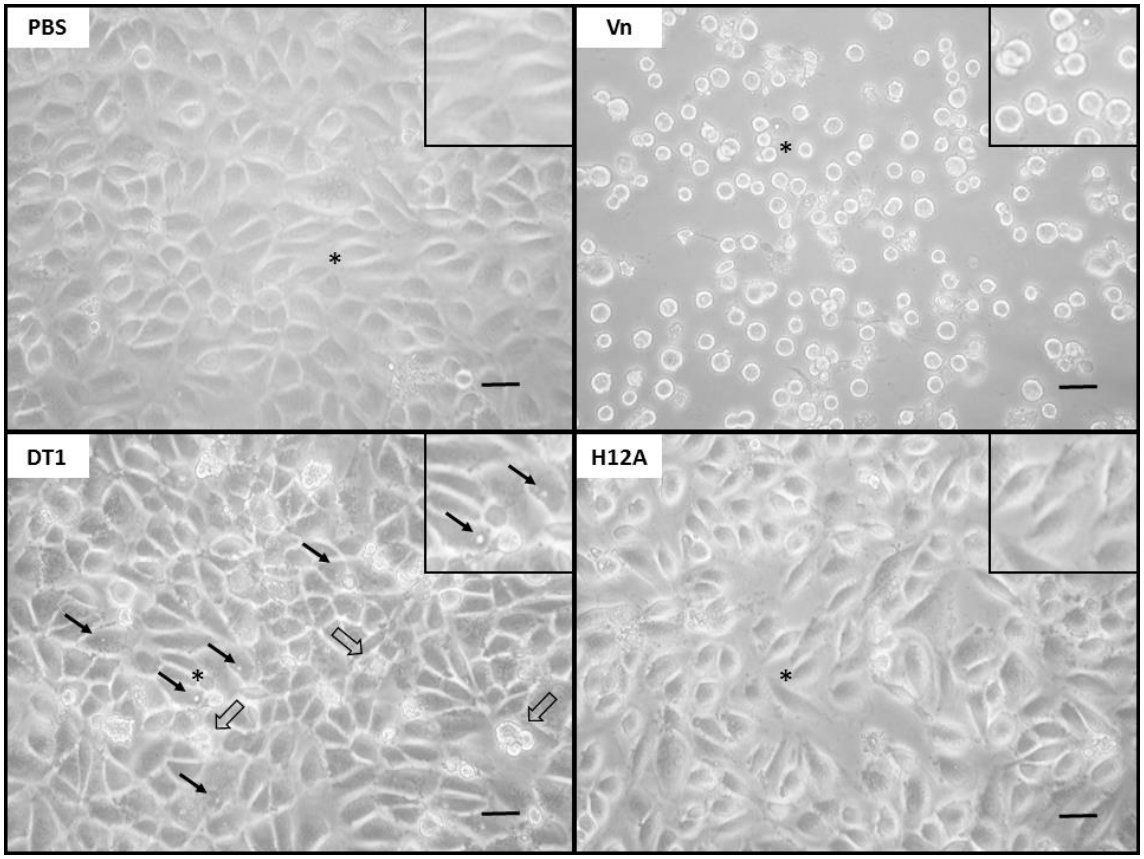


Células RAEC foram expostas à PBS, veneno de *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, e observadas após 6 horas. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido. Não é possível verificar diferenças entre as células expostas às LiRecDT1 H12A em comparaçao com as células expostas à PBS, contudo, as células expostas à LiRecDT1 apresentaram vacuolização citoplasmática (setas preenchidas) e morfologia arredondada (setas sem preenchimento). As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram-se com morfologia arredondada, indicando desadesão da matriz extracelular. Os asteriscos representam a àrea ampliada nos insertos. As barras representam 50µm. Células observadas com objetiva de 20x, com aumento digital da câmera de 2,6x, caracterizando aumento final de 520x.

Após 24 horas, as células expostas ao veneno se apresentaram desaderidas da matriz extracelular (Figura 15 - Vn). As células expostas à LiRecDT1 H12A apresentaram morfologia semelhante ao controle, contudo, algumas células possuiam aspecto refringente, indicando possivelmente a desadesão inicial da matriz extracelular devido à atividade residual da toxina mutada (Figura 15 – H12A). Diversas células expostas à LiRecDT1 apresentaram desadesão da matriz extracelular e retração do volume celular, além de vacuolização citoplasmática, porém, sob as condições avaliadas, as alterações morfológicas decorrentes da ação enzimática LiRecDT1 são muito

sutis se comparadas com as alterações apresentadas pelo veneno de *L. intermedia* (Figura 15 – DT1). Isto sugere que a citotoxicidade induzida pela toxina recombinante pode estar associada a eventos de sinalização em resposta à atividade da mesma, e não à danos diretos na membrana plasmática, ou degradação da matriz extracelular resultando na desadesão das células, como ocorre com o veneno.

FIGURA 15 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA LIRECDT1 EM CÉLULAS RAEC 24 HORAS APÓS A INCUBAÇÃO COM O VENENO E TOXINAS.



Células RAEC foram expostas à PBS, veneno de *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, e observadas após 24 horas. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de constraste de fase em microscópio invertido. É possível verificar a possível desadesão da matriz extracelular (aspecto refringente) das células expostas às LiRecDT1 H12A em comparaçao com as células expostas à PBS. As células expostas à LiRecDT1 apresentaram vacuolização citoplasmática (setas preenchidas) e morfologia arredondada e retraão do volume celular (setas sem preenchimento). As células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram-se com morfologia arredondada, indicando desadesão da matriz extracelular. Os asteriscos representam a àrea ampliada nos insertos. As barras representam 50µm. Células observadas com objetiva de 20x, com aumento digital da câmera de 2,6x, caracterizando aumento final de 520x.

6.2 Avaliação da interação da LiRecDT1/GFP com microdomínios de membrana de células RAEC

Uma vez que foram observadas alterações morfológicas após a exposição das células RAEC à LiRecDT1, e sabendo que a toxina interage com a membrana plasmática das mesmas (CHAIM *et al.*, 2011a), foi avaliada a possível interação da mesma com a membrana plasmática desta linhagem celular, em específico, regiões ricas em colesterol e esfingolipídeos, denominadas *lipid rafts*. Em um primeiro momento, as toxinas marcadas com o fluoróforo BODIPY®FL

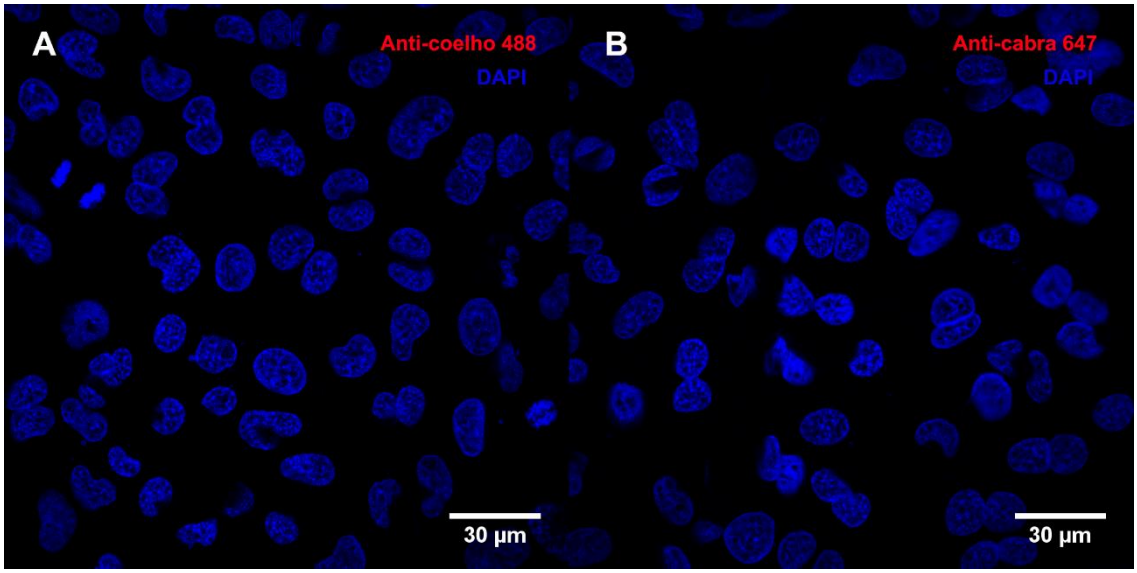
foram utilizadas. As células foram expostas as toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A marcadas com o fluoróforo (50 µg/mL) e observadas após 30 minutos, 1 hora e 4 horas de incubação. A marcação das *lipid rafts* foi realizada com anticorpo policlonal que reconhece caveolina-1, visualizada pela cor verde. Contudo, foi verificado que a conjugação das toxinas com o reagente BODIPY®FL foi ineficiente e não permitiu a visualização das toxinas por microscopia confocal, além de reduzir em aproximadamente 30% a atividade da toxina recombinante (dados não mostrados).

Desta forma, fez-se o uso apenas da LiRecDT1/GFP para visualização da interação da toxina com regiões de *lipid rafts* nas técnicas de microscopia de fluorescência confocal, microscopia de fluorescência de reflexão interna (TIRF), e microscopia de super-resolução (GSD).

6.2.1 Interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* de células RAEC observada por microscopia de fluorescência confocal

Primeiramente foram realizados controles visando a verificação da possível interação dos anticorpos anti-coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor® 488 e anti-cabra conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor® 647. Neste caso a reação ocorreu como descrito no item 5.8 de Material e Métodos, com exceção da incubação com os anticorpos primários utilizados neste trabalho. Após a obtenção das imagens, foi verificado que nenhum dos dois anticorpos secundários apresenta interação com qualquer estrutura celular, de modo que estes puderam ser utilizados para o desenvolvimento desta tese (Figura 16).

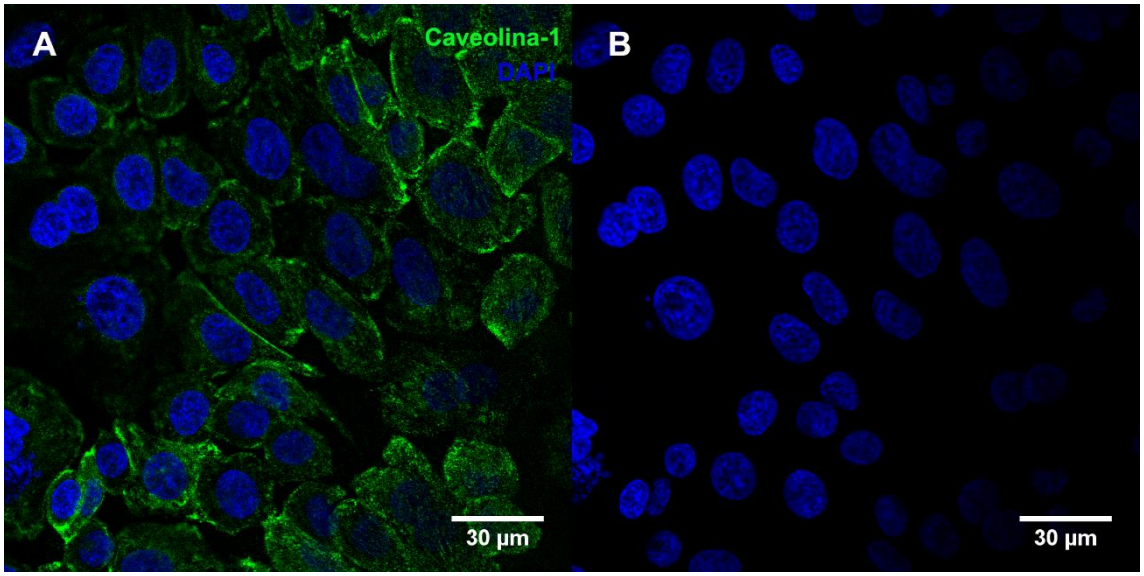
FIGURA 16 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DOS ANTICORPOS SECUNDÁRIOS COM CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC.



Células RAEC foram expostas aos anticorpos secundários utilizados para a detecção dos anticorpos primários utilizados neste trabalho e observadas após 4 horas de exposição. O núcleo celular foi marcado pelo reagente DAPI. O anticorpo secundário anti-coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor® 488, o qual deveria ser observado pela marcação em vermelho (A), não interage com estruturas das células desta linhagem. O anticorpo secundário anti-cabra conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor® 647, o qual deveria ser observado pela marcação em vermelho (B), não interage com estruturas das células desta linhagem Aumento de 630x.

Para a visualização da interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* de células RAEC, estas foram expostas à toxina recombinante (50 µg/mL) e observadas após 30 minutos, 1 hora e 4 horas de incubação. A marcação das *lipid rafts* foi realizada com anticorpo policlonal que reconhece caveolina-1, visualizada pela cor verde. A marcação da LiRecDT1/GFP foi realizada com anticorpo policlonal que reconhece a GFP, visualizada pela cor vermelha. Vale ressaltar que estas análises foram realizadas em duplicatas para o mesmo experimento, e em dois experimentos isolados. Como controle para avaliar se a proteína GFP não interage com as células da linhagem RAEC, a mesma foi incubada com as células sob as mesmas condições que a LiRecDT1/GFP e observadas após 4 horas de incubação. Após a análise das imagens, foi constatado que não há qualquer interação da proteína GFP com a referida linhagem celular (Figura 17).

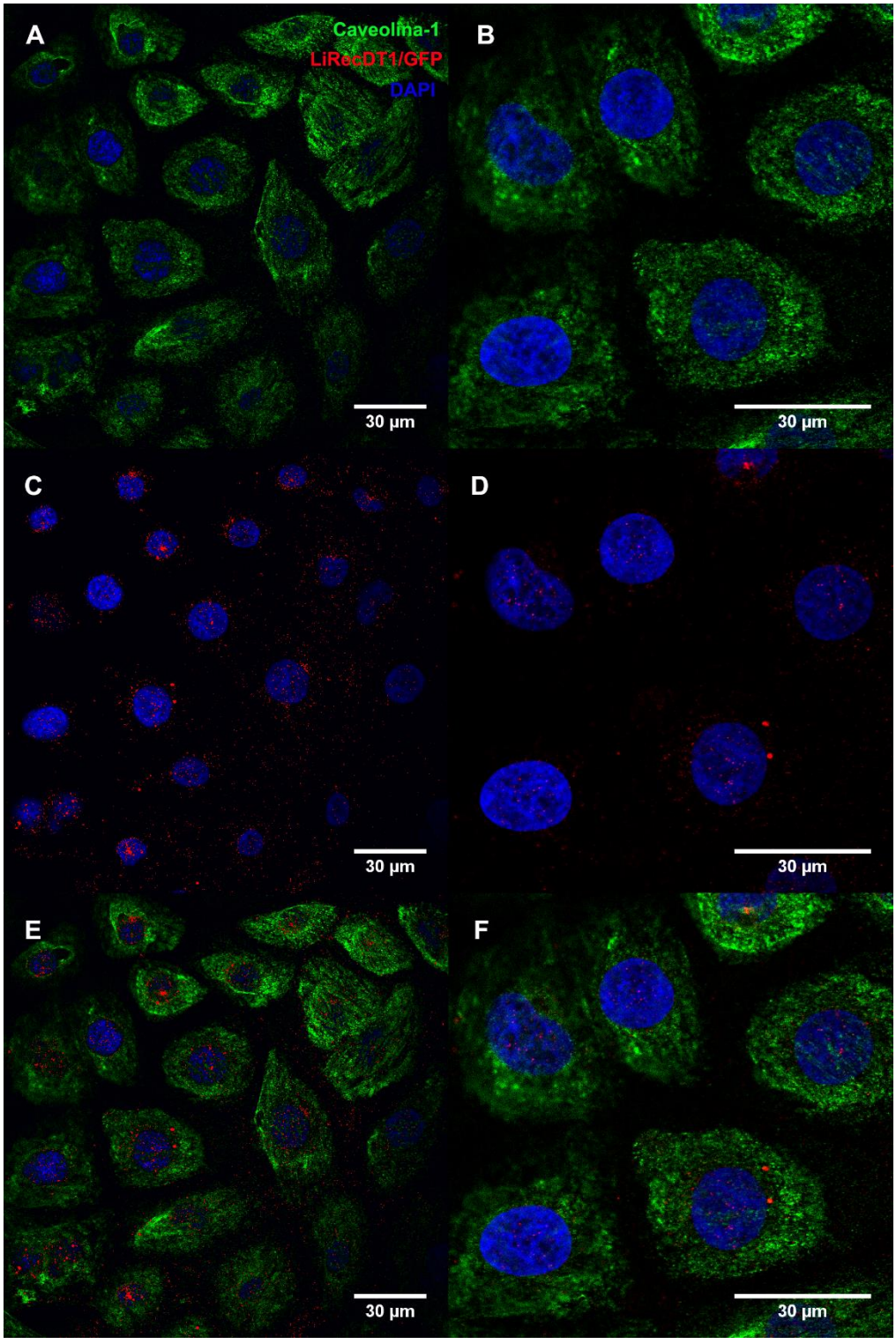
FIGURA 17 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA GFP COM CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC.



Células RAEC foram expostas à proteína GFP (50 µg/mL) e observadas após 4 horas de exposição. A caveolina-1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts* foi observada pela marcação em verde (A). A proteína GFP, a qual deveria ser observada pela marcação em vermelho (B), não interage com estruturas das células desta linhagem. Aumento de 630x.

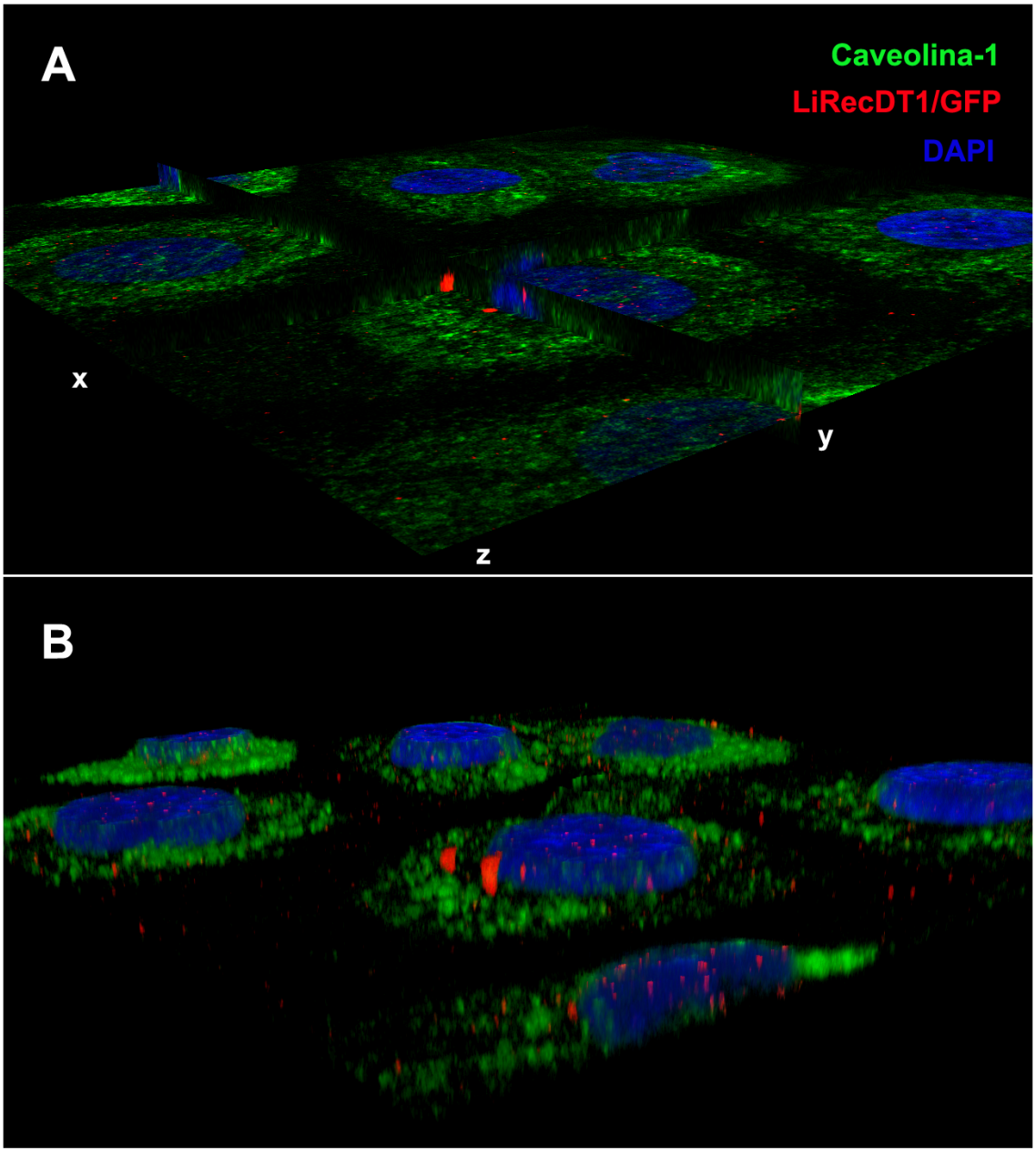
Após a confirmação de que a proteína GFP não interage com estruturas das células RAEC, foi avaliada a interação da toxina LIRecDT1/GFP com a membrana das mesmas. Após 30 minutos de exposição à toxina recombinante, é possível verificar que a toxina interage com a superfície celular, porém, não está co-localizada com as *lipid rafts* constituídas por caveolina-1 (Figura 18 – F). É importante ressaltar que a Figura 18 representa a imagem de um único ponto de foco do eixo Z. Para confirmar que a LiRecDT1/GFP não está dentro da célula, mas sim em sua superfície, foi realizada a análise das projeções ortogonal e tridimensional da Figura 18, tornando evidente a interação da toxina recombinante com a superfície celular, se ligando à membrana plasmática (Figura 19 – A e B).

FIGURA 18 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 30 minutos de exposição à toxina. A caveolina-1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts* foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1065x (B, D, e F).

FIGURA 19 – AUSÊNCIA DE INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.

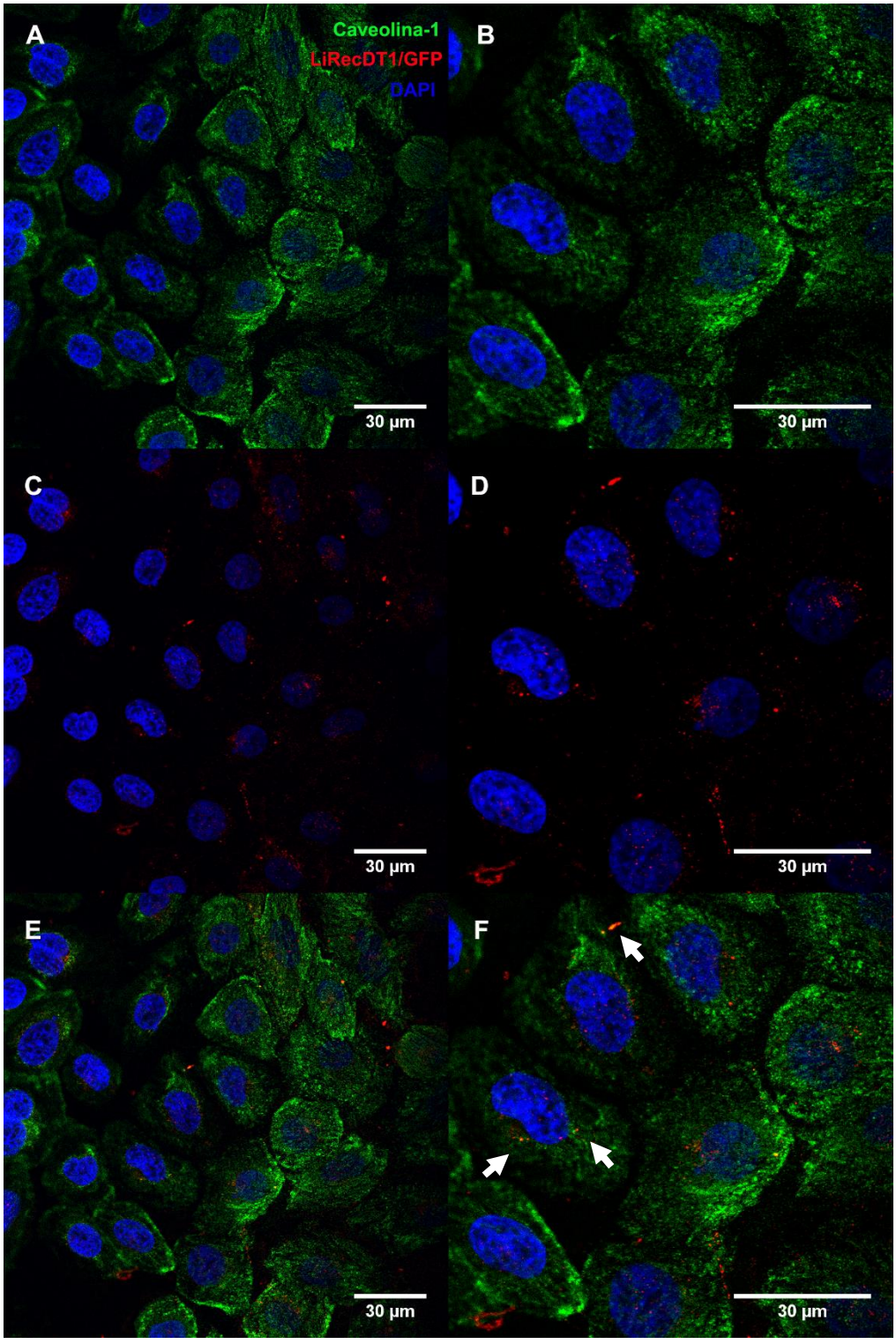


(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 30 minutos de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A caveolina-1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts* foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho.

No entanto, após 1 hora de exposição à toxina recombinante, verifica-se que em algumas regiões que contém caveolina-1, é possível verificar que a toxina aparenta interagir com as *lipid rafts*, sendo que os pontos de co-

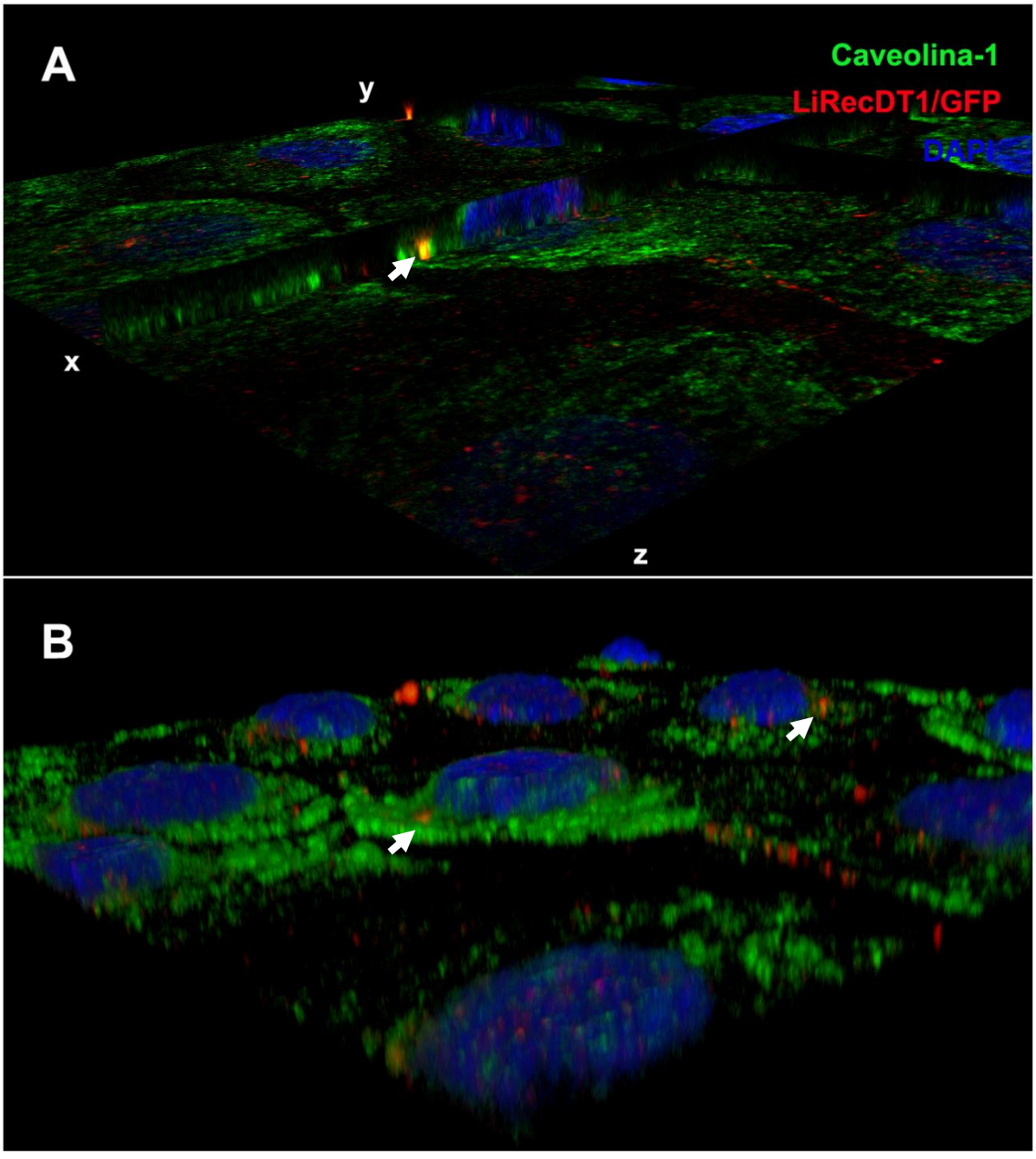
localização podem ser visualizados pela cor amarela/laranja, indicando que a LiRecDT1 e a caveolina-1 estão no mesmo plano focal e na mesma região de marcação (Figura 20 – E e F). Ainda, as projeções ortogonal e tridimensional da Figura 20, evidenciaram que além de ocorrer a interação da toxina recombinante com a superfície celular, esta se encontra, ainda que de forma sutil, co-localizada com a proteína caveolina-1 em *lipid rafts* (Figura 21 – A e B).

FIGURA 20 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 1 hora de exposição à toxina. A caveolina-1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts* foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a caveolina-1 caracterizando as *lipid rafts* são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1065x (B, D, e F).

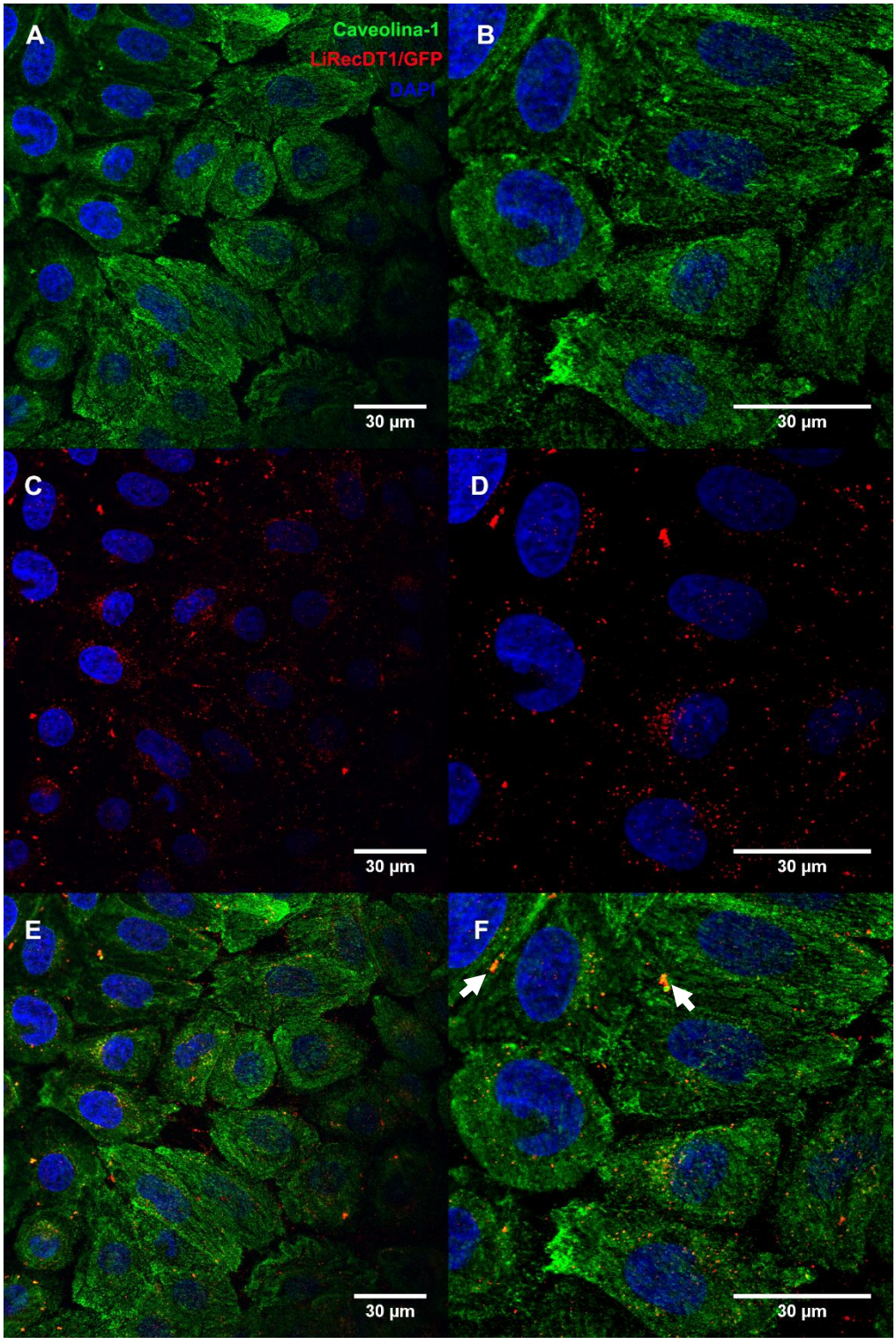
FIGURA 21 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 1 hora de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A caveolina-1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts* foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho. Pontos de co-localização estão representados em amarelo/laranja, apontados pelas setas.

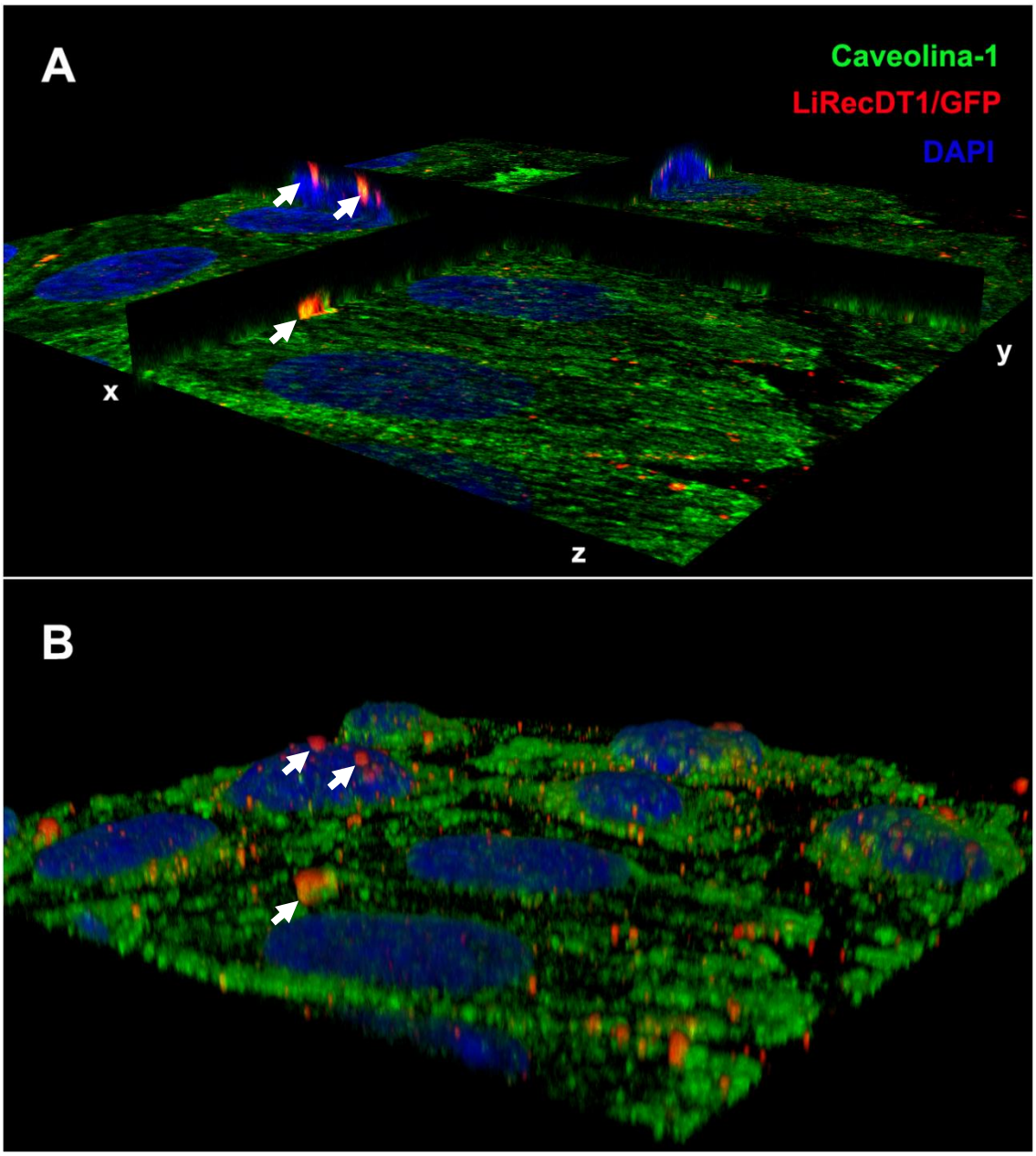
Ainda, após 4 horas de exposição à toxina recombinante, verifica-se que regiões as quais a LiRecDT1 interage com a membrana plasmática são também regiões que contém caveolina-1, como observado pela co-localização de ambas as proteínas caracterizada pela coloração amarela/laranja. Desta maneira, a interação da toxina recombinante com as *lipid rafts* ocorre de forma mais evidente se comparado com o tempo de 1 hora, indicando que a interação da LiRecDT1 com estas estruturas ocorre de maneira tempo-dependente (Figura 22 – E e F). As projeções ortogonal e tridimensional da Figura 22 tornam mais evidentes a interação da LiRecDT1/GFP com regiões de *lipid rafts* das células RAEC (Figura 23 – A e B). É importante ressaltar que esta é a primeira evidência de que a LiRecDT1 interage com *lipid rafts* da membrana de células endoteliais. Sendo este um evento tempo-dependente, como mostrado anteriormente, sugere-se que a toxina recombinante promove uma reorganização da membrana plasmática e o agregamento destes microdomínios, para então interagir diretamente com os mesmos.

FIGURA 22 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 4 horas de exposição à toxina. A caveolina-1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts* foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis "A" e "C", "B" e "D" é visualizada nos paineis "E" e "F", respectivamente. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a caveolina-1 caracterizando as *lipid rafts* são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1065x (B, D, e F).

FIGURA 23 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



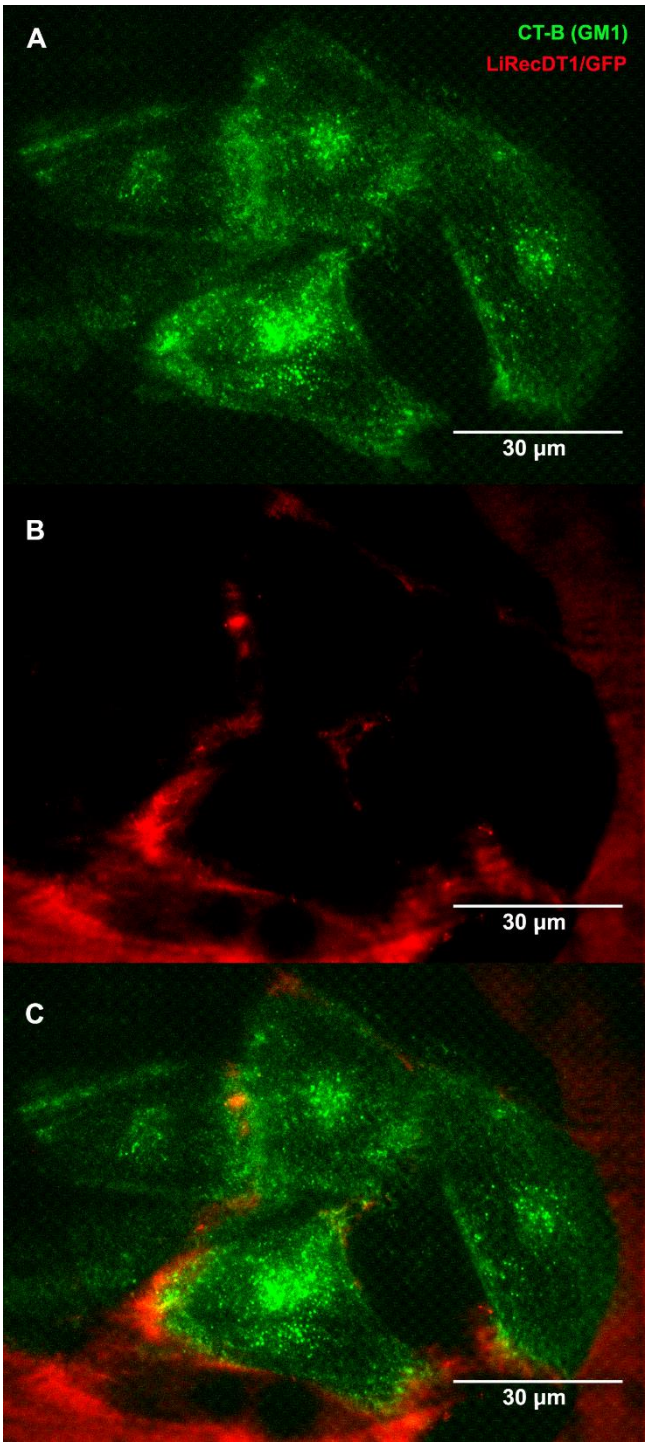
(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 4 horas de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A caveolina-1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts* foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho. Pontos de co-localização estão representados em amarelo/laranja, apontados pelas setas.

6.2.2 Interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* células RAEC observada por microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRF)

Tendo em vista a observação da co-localização da LiRecDT1/GFP com regiões de *lipid rafts* formadas por caveolina-1, e a fim de confirmar, por uma segunda metodologia, que a toxina recombinante interage com estes microdomínios na membrana plasmática, fez-se uso da microscopia de reflexão interna total (TIRF). O fenômeno de reflexão interna total é atingido quando o laser utilizado para a excitação dos fluoróforos da amostra é alinhado em um ângulo específico em relação à região de contato das células sobre a lamínula/placa, de modo que o raio de luz, ao atingir a amostra, é refletido em um ângulo de 90° em relação ao ângulo de incidência inicial do laser. A reflexão do raio de luz gera uma onde eletromagnética conhecida como onda evanescente, com o mesmo comprimento de onda do feixe do laser, e esta se propaga cerca de 100 nm no eixo “z” em relação à amostra, se dissipando gradualmente durante o processo. Desta forma, a onda evanescente excita os fluoróforos presente apenas na região de contato das células com a lamínula, ou seja, a fluorescência observada corresponde a porções da membrana plasmática das células (FISH, 2009).

Para o experimento utilizando a microscopia TIRF, as células foram incubadas primeiramente com a subunidade β da toxina colérica (CT-B), a qual se liga a *lipid rafts* ricas em gangliosídeos GM1, e então expostas à LiRecDT1 (50 µg/mL) por 4 horas. Assim como observado na microscopia de fluorescência confocal, após 30 minutos de exposição à toxina recombinante, é possível verificar a interação da LiRecDT/GFP com a superfície celular, contudo, não há pontos onde ocorre a co-localização com a CT-B (Figura 24 - C).

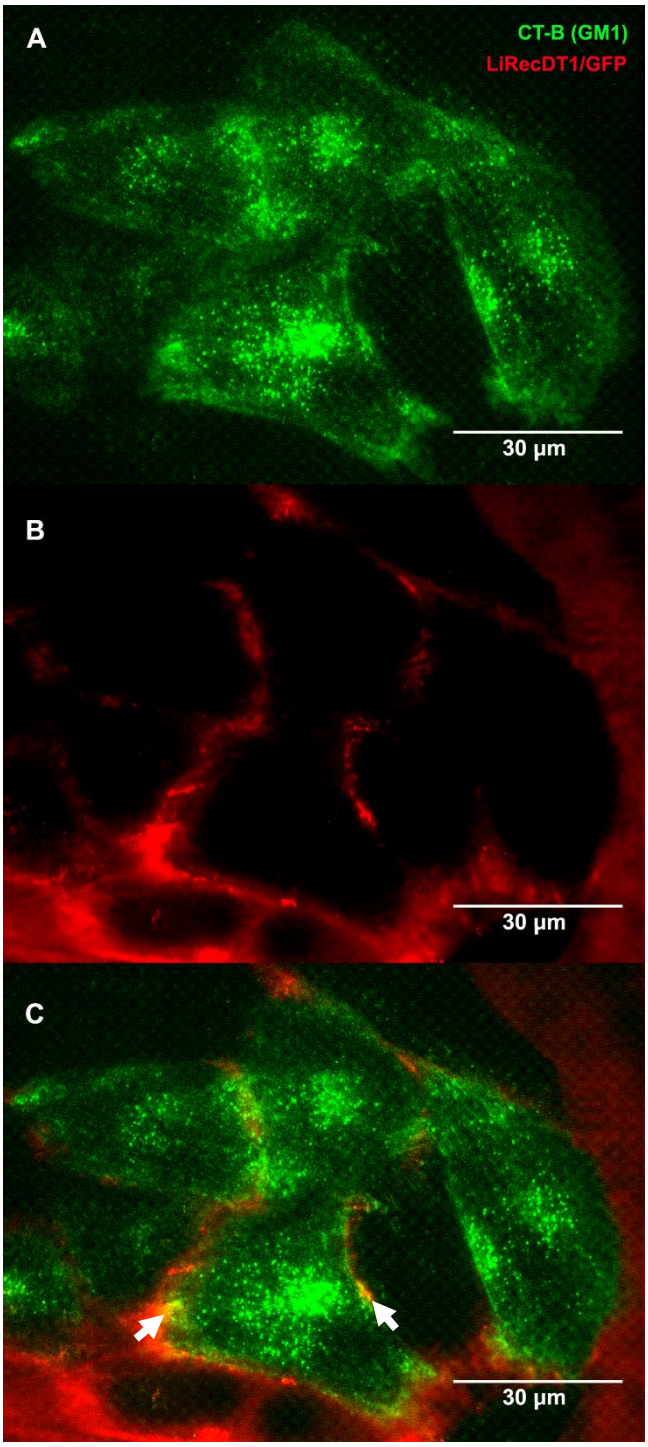
FIGURA 24 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – ANÁLISE POR MICROSCOPIA TIRF.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 30 minutos de exposição à toxina. A subunidade β da toxina colérica (CT-B) ligada ao gangliosídeo GM1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts,* foi observada pela marcação em verde (A). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (B). A sobreposição dos paineis “A” e “B” é visualizada no painel “C. Células observadas com objetiva de 63x, com aumento digital de 1,69x, caracterizando aumento final de 1065x.

Contudo, após 1 hora de exposição à toxina recombinante, é possível verificar que a LiRecDT1/GFP interage com regiões de *lipid rafts*, uma vez que é possível verificar áreas de cor amarela/laranja indicando pontos de co-localização da toxina recombinante com a CT-B (Figura 25 - C).

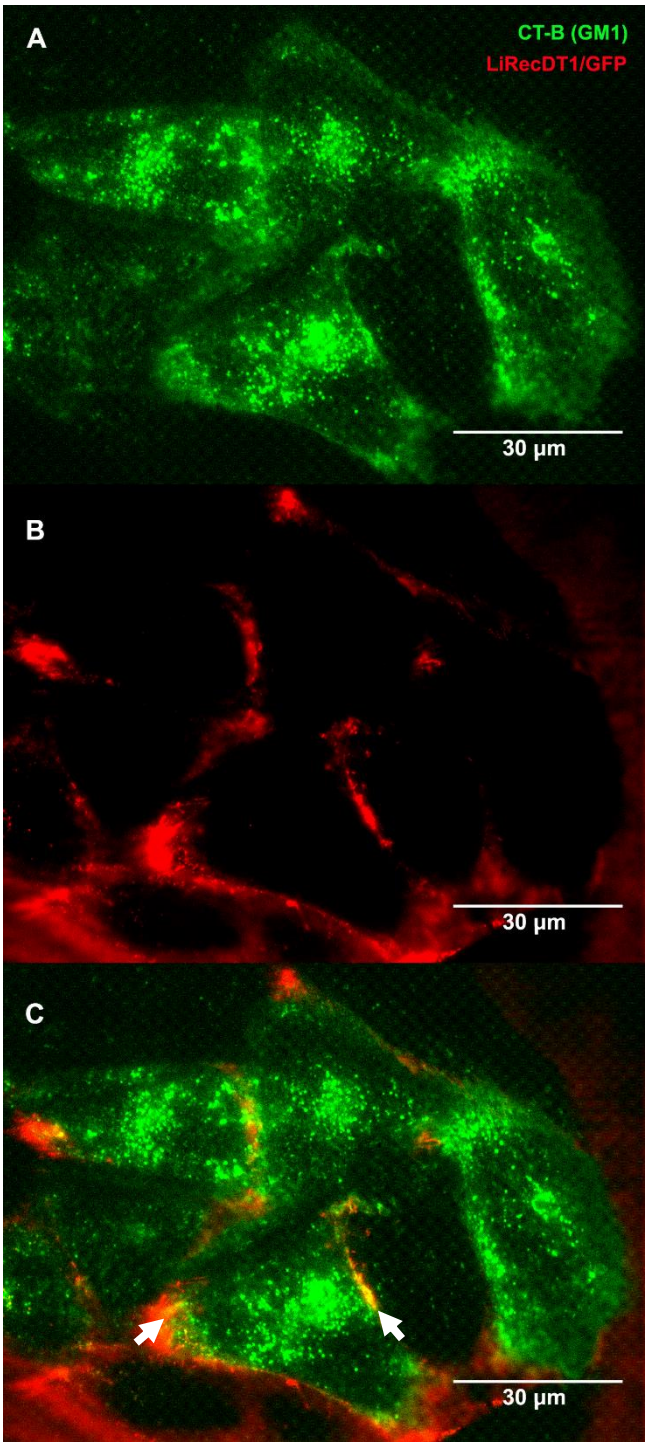
FIGURA 25 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – ANÁLISE POR MICROSCOPIA TIRF.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 1 hora de exposição à toxina. A subunidade β da toxina colérica (CT-B) ligada ao gangliosídeo GM1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts,* foi observada pela marcação em verde (A). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (B). A sobreposição dos paineis “A” e “B” é visualizada no painel “C”. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a CT-B caracterizando as *lipid rafts* são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas. Aumento de 1065x.

Corroborando ainda os dados obtidos pela microscopia de fluorescência confocal, após 4 horas de exposição à LiRecDT1/GFP, é possível verificar a co-localização da mesma com a CT-B, sendo este evento mais evidente, se comparado com a análise realizada para o tempo de 1 hora de incubação, corroborando a hipótese de que a interação da LiRecDT1/GFP com estas estruturas ocorre de maneira tempo-dependente (Figura 26 – C). Uma vez que a microscopia TIRF é utilizada para a visualização de eventos que ocorrem na região da membrana plasmática, os dados a partir desta técnica confirmam o fato de que além de se ligar à membrana das células endoteliais, há reorganização dos microdomínios de membrana, com agregamento dos mesmos, e a partir de 1 hora, a toxina está presente em *lipid rafts* constituídas por por gangliosídeos GM1.

FIGURA 26 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – ANÁLISE POR MICROSCOPIA TIRF.

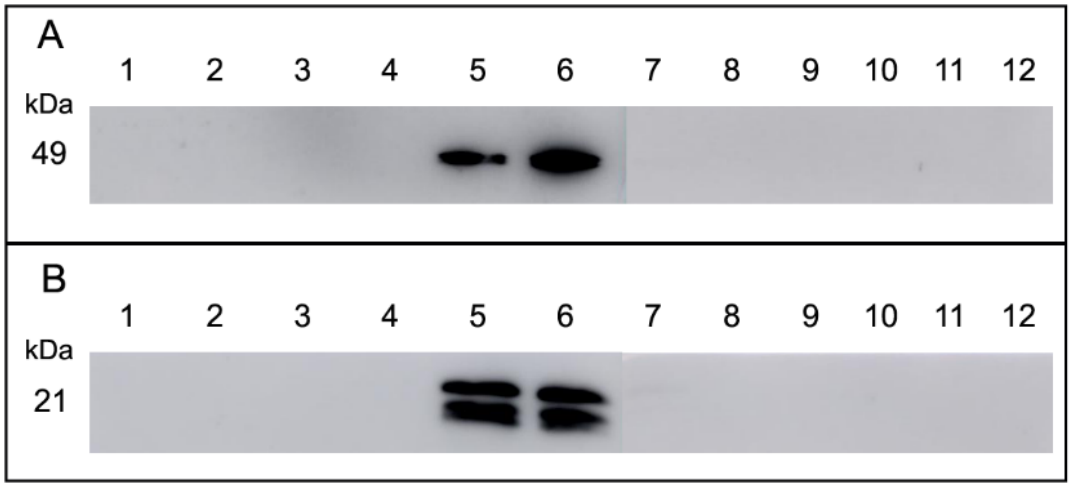


Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 4 horas de exposição à toxina. A subunidade β da toxina colérica (CT-B) ligada ao gangliosídeo GM1, representando a região da membrana plasmática caracterizada por *lipid rafts,* foi observada pela marcação em verde (A). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (B). A sobreposição dos paineis “A” e “B” é visualizada no painel “C”. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a CT-B caracterizando as *lipid rafts* são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas. Aumento de 1065x.

6.2.3 Isolamento de *lipid rafts* de células RAEC por ultracentrifugação em gradiente de sacarose e identificação por *western-blot*

Uma vez que foi observada a ligação da LiRecDT1/GFP na membrana plasmática de células da linhagem RAEC, bem como sua subsequente interação com *lipid rafts* caracterizadas pela presença de caveolina-1 e gangliosídeo GM1, foi realizado o fracionamento da membrana plasmática e isolamento destes microdomínios por gradiente de sacarose, com o intuito de verificar a presença da LiRecDT1 nas *lipid rafts* da linhagem celular em estudo, bem como a busca de parceiros moleculares que poderiam estar associados à toxina, agindo como possíveis receptores para a mesma. Após o fracionamento por gradiente de sacarose, 12 amostras de mesmo volume foram retiradas partindo-se da região superior à inferior do tubo, e avaliadas por *western-blot*, visando a determinação das frações que continham as proteínas caveolina-1 e flotilina-1, ambas presentes em *lipid rafts*. Após a avaliação do resultado, foi observado que a caveolina-1 e a flotilina-1, com massas moleculares de 21 kDa e 49 kDa, respectivamente, foram observadas majoritariamente nas frações 5 e 6 (Figura 27 A e B), indicando que o isolamento destes microdomínios foi realizado com sucesso. Contudo, até o presente momento, não foi possível realizar a identificação da toxina por esta metodologia de fracionamento. É importante ressaltar que os resultados obtidos são provenientes de três experimentos independentes.

FIGURA 27 – ISOLAMENTO DE *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE.



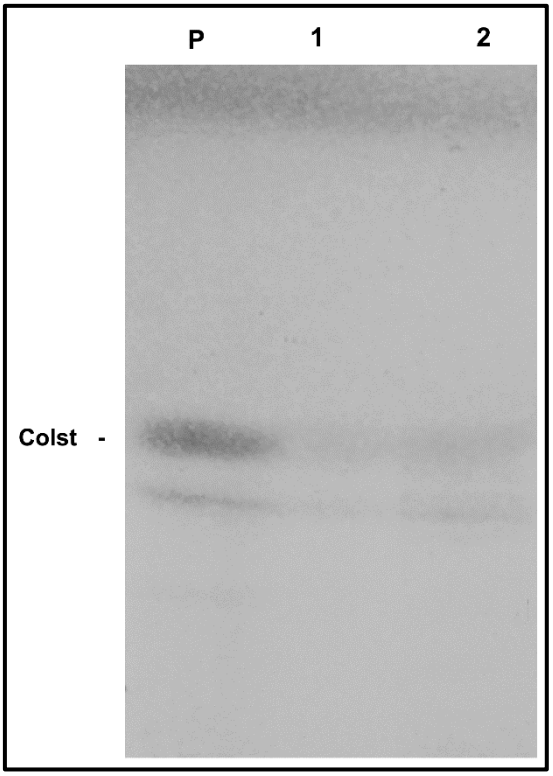
Células RAEC foram submetidas à lise celular e subsequente ultracentrifugação em gradiente de sacarose 45%-35%-5%. Após, 12 frações de 800µL foram coletadas, da região superior à inferior do tubo, precipitadas com ácido acético 10%, e por fim, analisadas por *western-blotting*. A flotilina-1 (A) e caveolina-1 (B) estão representadas com massa molecular aproximada de 49 kDa e 21 kDa, respectivamente. A presença de *lipid rafts* nas frações 5 e 6 é caracterizada pela identificação de ambas as proteínas nas referidas amostras.

6.2.4 Padronização da análise do conteúdo lipídico do fracionamento do extrato de células RAEC por HPTLC

Após a obtenção das frações enriquecidas em *lipid rafts* (*pool* das frações 4, 5 e 6) e não-enriquecidas em *lipid rafts* (*pool* das frações 9, 10 e 11) referentes ao grupo controle sem tratamento com toxinas, a padronização da análise do conteúdo lipídico das amostras foi avaliado por HPTLC. Foram realizadas colorações para três classes lipídicas distintas com o intuito de abranger o maior espectro de lipideos possíveis presentes nas amostras em estudo: esteróis, fosfolipídeos e esfingolipídeos.

A análise de esteróis permitiu a visualização de bandas referentes ao colesterol nas amostras enriquecidas em *lipid rafts* e também nas amostras não enriquecidas em *lipid rafts*, indicando que o fracionamento do extrato celular em gradiente de sacarose é eficiente para a separação das *lipid rafts* sem afetar a integridade de outras regiões da membrana plasmática não caracterizadas por estes domínios (Figura 28).

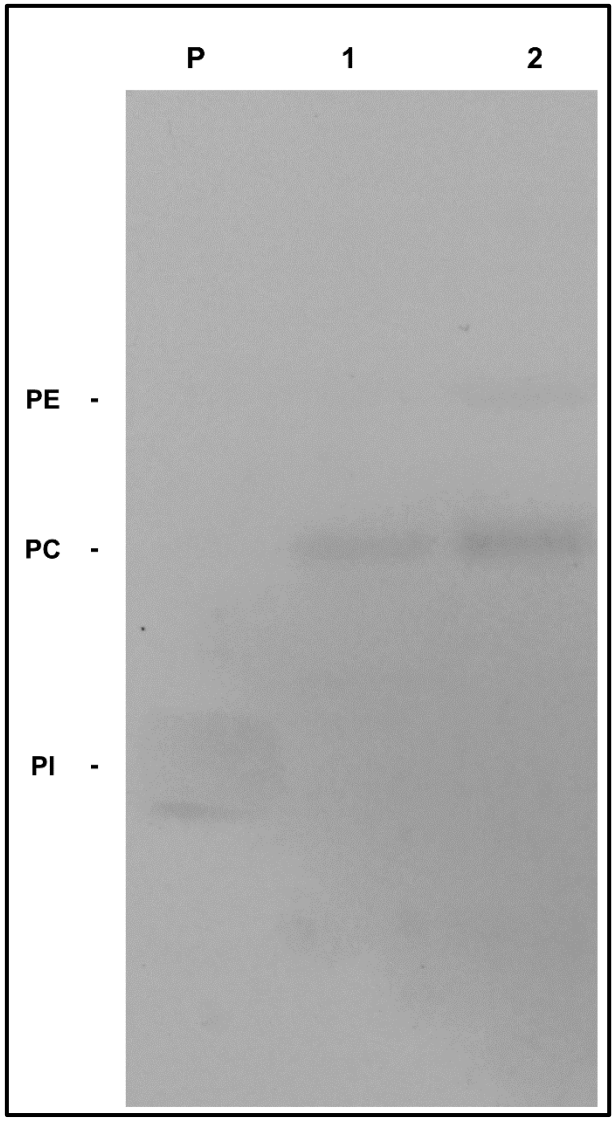
FIGURA 28 – AVALIAÇÃO POR HPTLC DE ESTERÓIS PRESENTES NAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS OU NÃO EM *LIPID RAFTS* APÓS FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE.



As bandas referentes ao colesterol foram visualizadas após coloração com $CuSO_4$ e H_2SO_4. A marcação em "P" representa o padrão lipídico conhecido para colesterol (Colst). A marcação em "1" representa o *pool* das frações 4, 5 e 6 enriquecidas em *lipid rafts*, e a marcação em "2" representa o *pool* das frações 9, 10 e 11 não enriquecidas em *lipid rafts*. Ambas as amostras apresentam perfil semelhante de colesterol.

A análise de fosfolipídeos permitiu a visualização de bandas referentes à fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina em ambas as amostras avaliadas, contudo, as amostras enriquecidas em *lipid rafts* aparentam possuir menos fosfatidiletanolamida em relação às amostras não enriquecidas em *lipid rafts*, evidenciando uma possível escassez deste lipídeo nestes microdomínios de membrana (Figura 29).

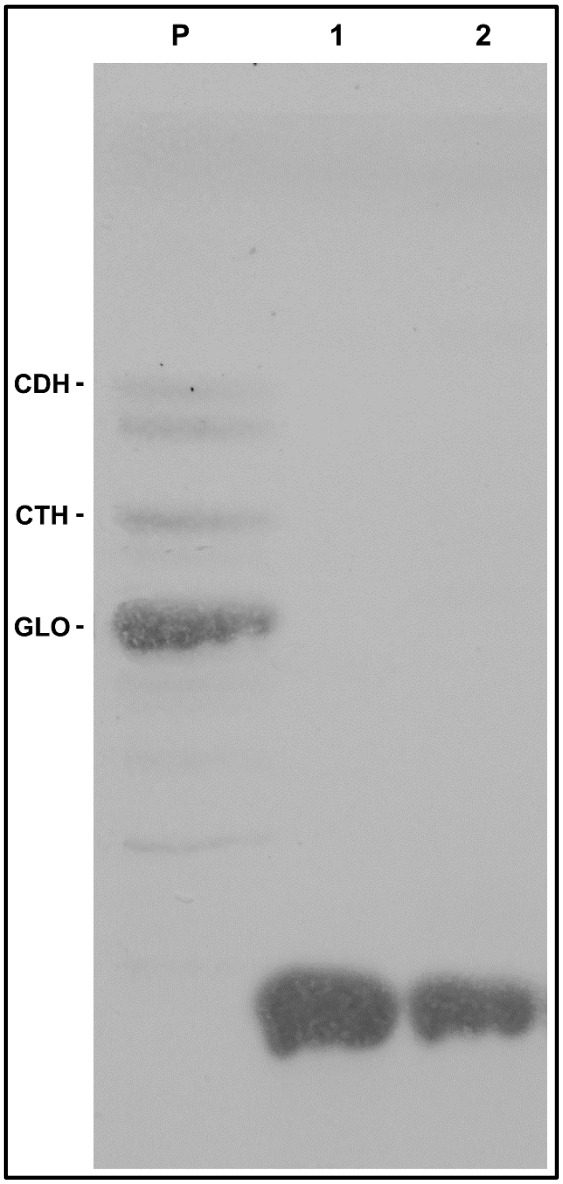
FIGURA 29 – AVALIAÇÃO POR HPTLC DE FOSFOLIPÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS OU NÃO EM *LIPID RAFTS* APÓS FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE.



As bandas referentes aos fosfolipídeos foram visualizadas após coloração com Molibdenium Blue. A marcação em "P" representa o padrão lipídico conhecido para os fosfolipídeos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI). A marcação em "1" representa o *pool* das frações 4, 5 e 6 enriquecidas em *lipid rafts*, e a marcação em "2" representa o *pool* das frações 9, 10 e 11 não enriquecidas em *lipid rafts*. As frações enriquecidas em *lipid rafts* aparentam possuir menor concentração de fosfatidiletanolamina em relação as frações não enriquecidas nestes microdomínios.

Por fim, análise de glicolipídeos não permitiu a visualização de bandas referentes à qualquer tipo de lipídeo desta classe. As únicas bandas visualizadas nas amostras avaliadas são referentes à sacarose, proveniente do fracionamento realizado em etapas anteriores (Figura 30).

FIGURA 30 – AVALIAÇÃO POR HPTLC DE GLICOLIPÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS OU NÃO EM *LIPID RAFTS* APÓS FRACIONAMENTO EM GRADIENTE DE SACAROSE.



As bandas referentes aos glicolipídeos foram visualizadas após coloração com primulina e então solução de orcinol/H_2SO_4. A marcação em "P" representa o padrão lipídico conhecido para os glicolipídeos ceramida dihexosil (CDH), ceramida trihexosil (CTH) e globosídeo (GLO). A marcação em "1" representa o *pool* das frações 4, 5 e 6 enriquecidas em *lipid rafts*, e a marcação em "2" representa o *pool* das frações 9, 10 e 11 não enriquecidas em *lipid rafts*. Não foi possível visualizar bandas referentes à qualquer glicolipídeo nas amostras avaliadas.

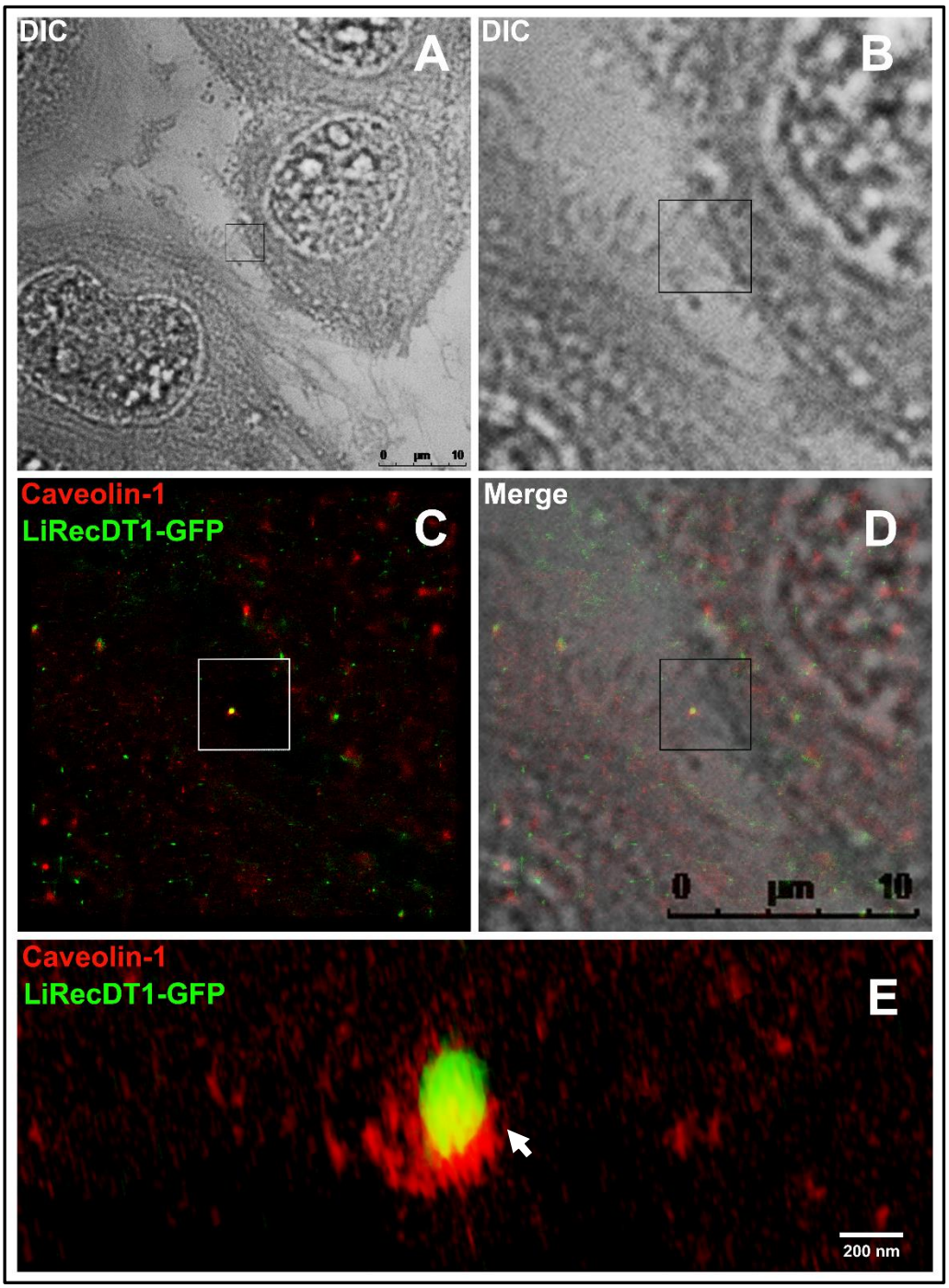
Desta forma, conclui-se que a quantidade de amostra utilizada para a realização da análise por HPTLC deve ser superior à utilizada, uma vez que mesmo nas análises de esteróis e fosfolipídeos foram visualizadas bandas de baixa intensidade. Ainda, em passos subsequentes ao fracionamento, ressalta-se a importância da realização de mais passos de lavagens, para a remoção

completa da sacarose. Desta forma, novas condições experimentais devem ser realizadas para a avaliação do conteúdo lipídico das frações enriquecidas ou não em *lipid rafts* antes da avaliação da possível modulação dos lipídeos de células da linhagem RAEC pelas toxinas recombinantes.

6.2.5 Interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* de células RAEC observada por microscopia de super-resolução

Visando observar com maior precisão a forma como a LiRecDT1/GFP interage com as *lipid rafts* que contém caveolina-1, foi realizada a análise da co-localização de ambas as proteínas por microscopia de super-resolução. Visto que os resultados obtidos até então evidenciaram maior interação da LiRecDT1/GFP com *lipid rafts* de células RAEC após 4 horas de exposição, a análise foi realizada inicialmente para este mesmo intervalo de tempo. Após a aquisição da imagem, foi possível verificar que a LiRecDT1/GFP de fato interage com regiões da membrana plasmática que contém caveolina-1, como observado pela co-localização de ambas as proteínas caracterizada pela coloração amarela/laranja (Figura 31 – C). Ainda, foi possível visualizar uma caveola contendo a LiRecDT1/GFP, indicando que a proteína recombinante está sendo endocitada via cavéolas e endereçada para compartimentos intracelulares (Figura 31 – E). É importante ressaltar que os dados obtidos são provenientes de uma duplicata realizada em um experimento.

FIGURA 31 – INTERAÇÃO DA LIRECDT1/GFP COM *LIPID RAFTS* DE CÉLULAS RAEC E INTERNALIZAÇÃO VIA CAVEOLAS APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 4 horas de exposição à toxina. Os paineis “A” e “B” representam as células observadas por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). A caveolina-1, representando *lipid rafts* foi observada pela marcação em vermelho (C, D, e E). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em verde (C, D, e E). A sobreposição dos paineis “B” e “C” é visualizada no painel “D”, evidenciando a localização das proteínas na membrana plasmática das células. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a caveolina-1 caracterizando as *lipid rafts* são visualizados pela cor amarela/laranja. O painel “E” representa o aumento da estrutura visualizada em “C” e “D” marcada pelo quadrado, evidenciando a formação de uma cavéola contendo a LiRecDT1. Aumento de 630x (A), 910x (B, C e D) e 1600x (F).

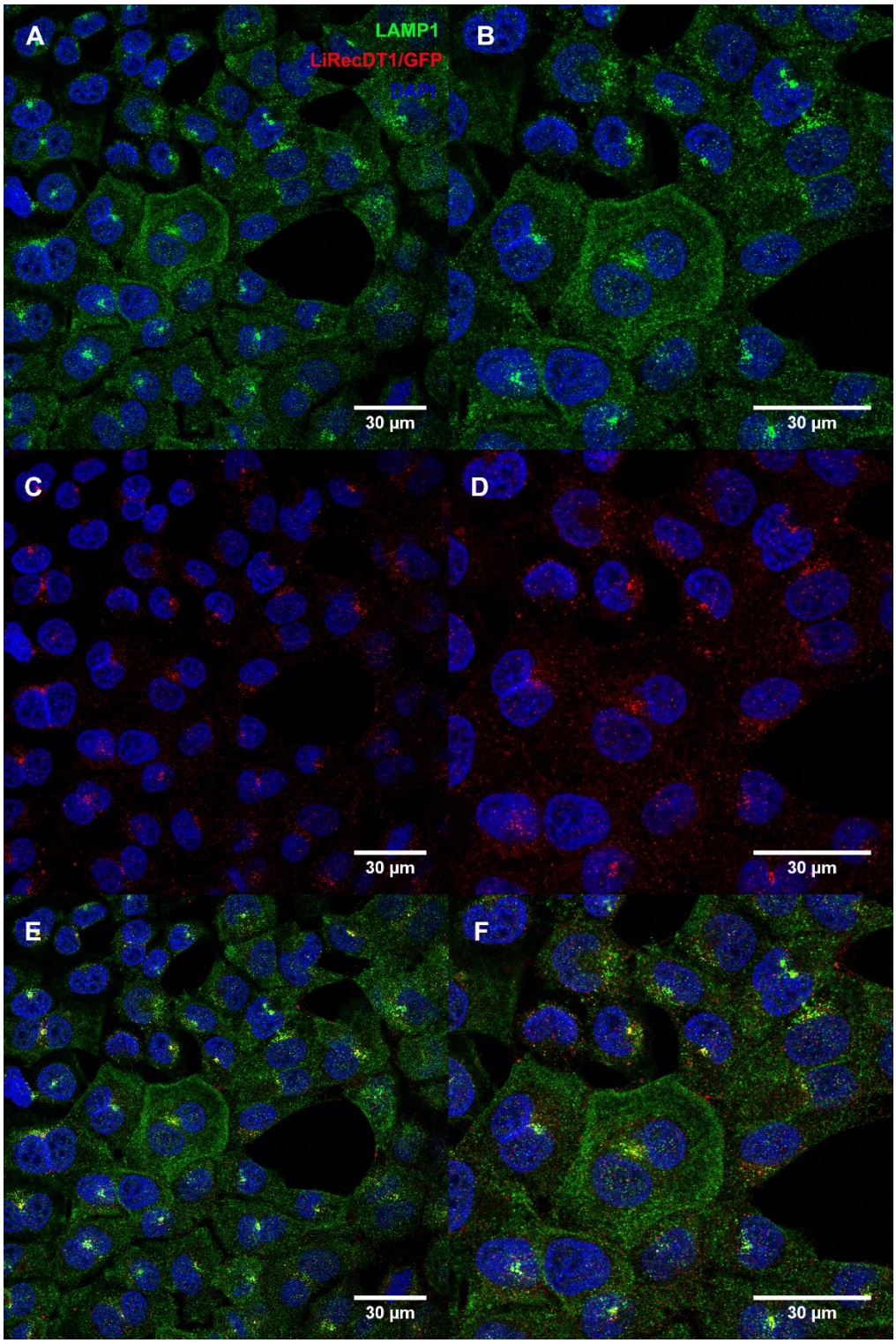
6.3 Avaliação da internalização da LiRecDT1/GFP em células RAEC

Sabendo que a LiRecDT1/GFP interage com *lipid rafts* constituídas por caveolina-1 e gangliosídeos GM1 de maneira tempo-dependente, e que a toxina aparentemente está sendo endocitada via cavéolas, como visto na microscopia de super-resolução, buscou-se avaliar se após a interação com a membrana, a toxina recombinante poderia estar sendo endocitada e endereçada à compartimentos intracelulares, como os do sistema endossomo/lisossomo. Para tanto, as células foram expostas à toxina recombinante LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 30 minutos, 1 hora e 4 horas de incubação. A marcação das vesículas do sistema endossomo/lisossomo foi realizada com anticorpos policlonais que reconhecem as proteínas associadas à membrana lisossomal LAMP1 e LAMP2, visualizadas pela cor verde. A marcação da LiRecDT1/GFP foi realizada com anticorpo policlonal que reconhece a GFP, visualizada pela cor vermelha. Vale ressaltar que estas análises foram realizadas em duplicatas para o mesmo experimento, e em dois experimentos isolados.

6.3.1 Endereçamento da LiRecDT1/GFP para o sistema endossomo/lisossomo de células RAEC por microscopia confocal

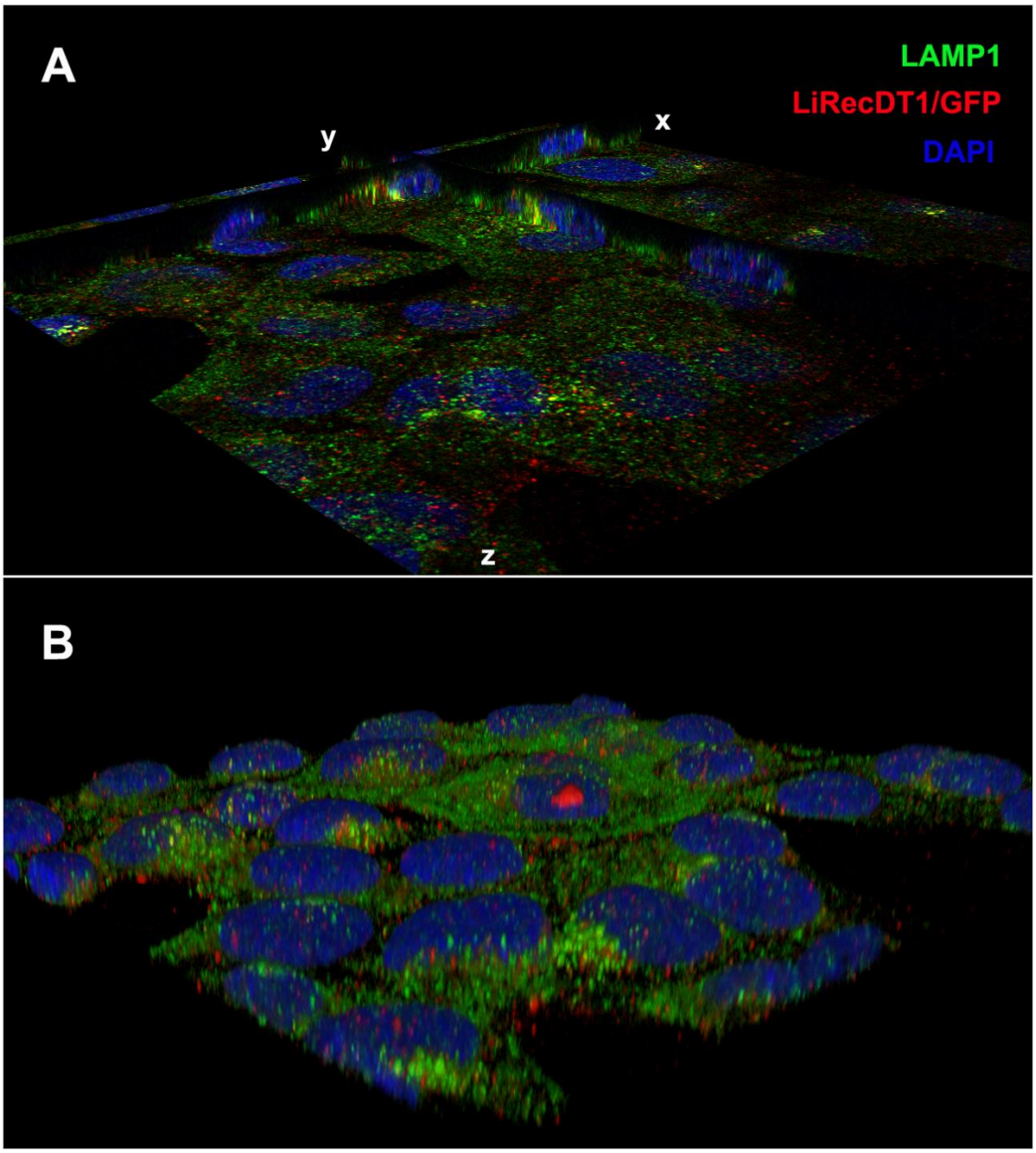
Após 30 minutos de exposição à toxina recombinante, os dados obtidos reveleram que não foi possível verificar a presença das toxinas em vesículas do sistema endossomo/lisossomo marcadas tanto com anticorpos que reconhecem as proteínas LAMP1 (Figura 32) e LAMP2 (Figura 34). Ainda, mesmo as projeções ortogonal e tridimensional das Figuras 32 e 34 (Figuras 33 e 35) não revelam a co-localização da LiRecDT1/GFP em compartimentos marcados pelas proteínas LAMP1 e LAMP2.

FIGURA 32 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1.



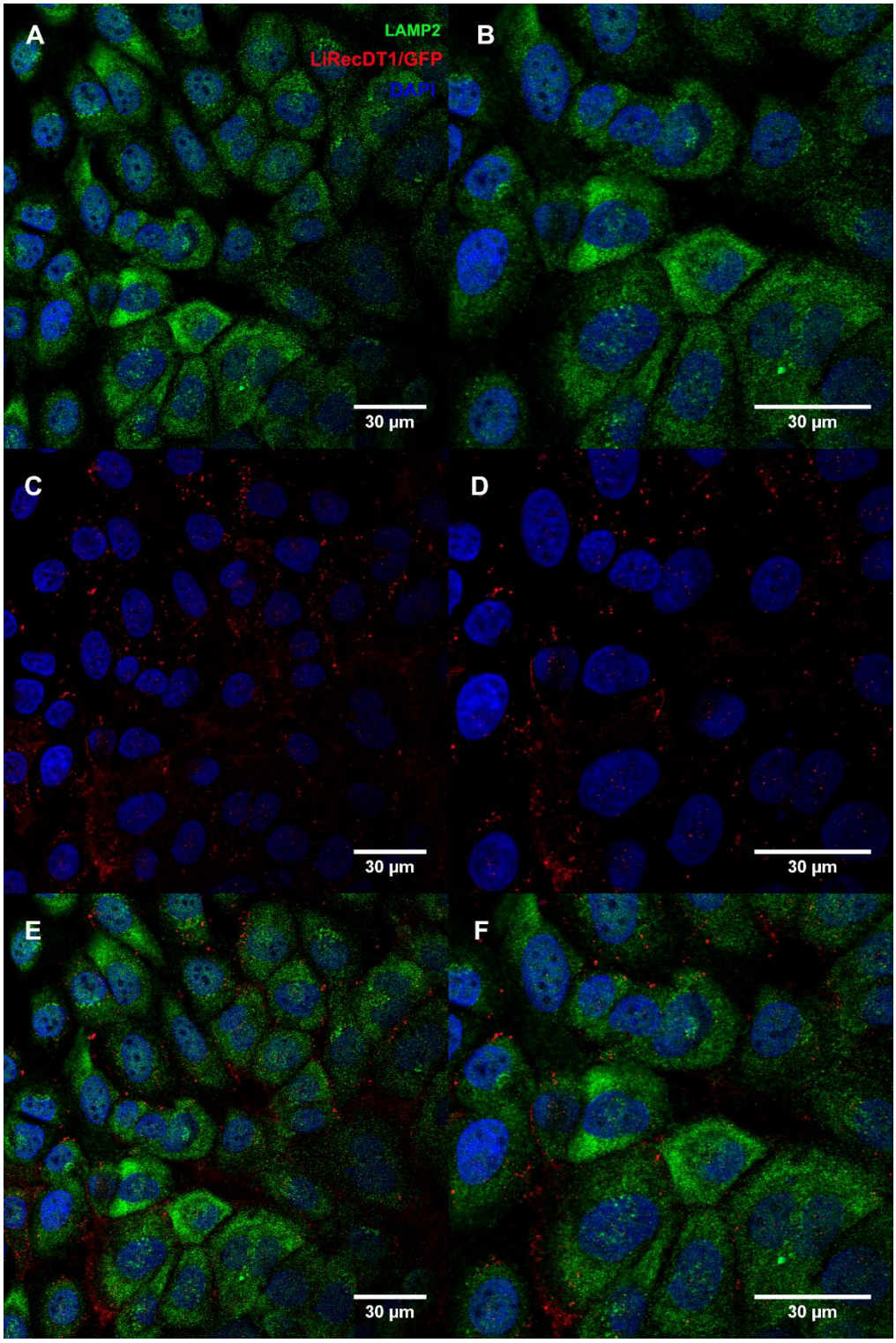
Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 30 minutos de exposição à toxina. A proteína LAMP1, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1025x (B, D, e F).

FIGURA 33 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



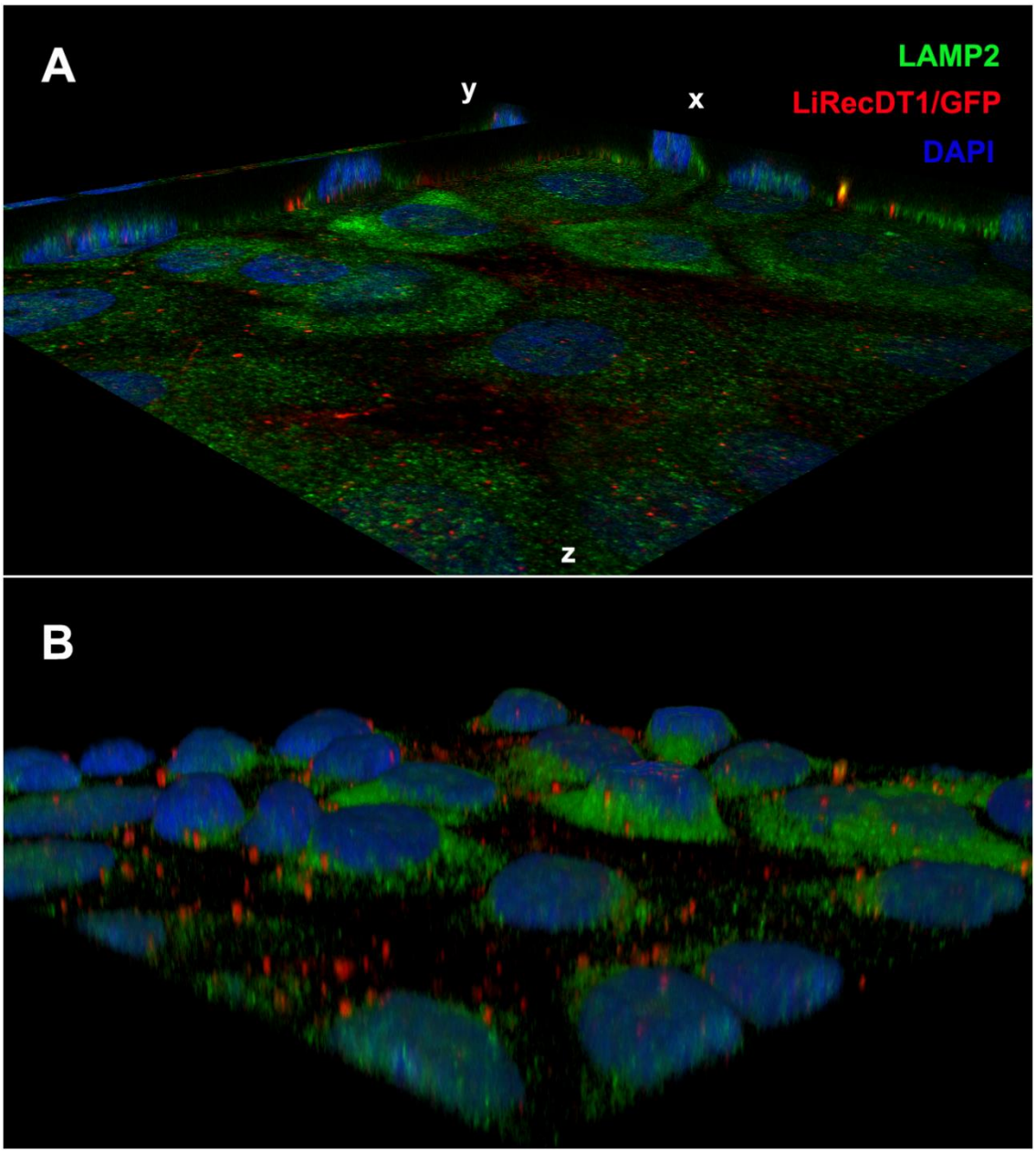
(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 30 minutos de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A proteína LAMP1, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho.

FIGURA 34 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 30 minutos de exposição à toxina. A proteína LAMP2, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1025x (B, D, e F).

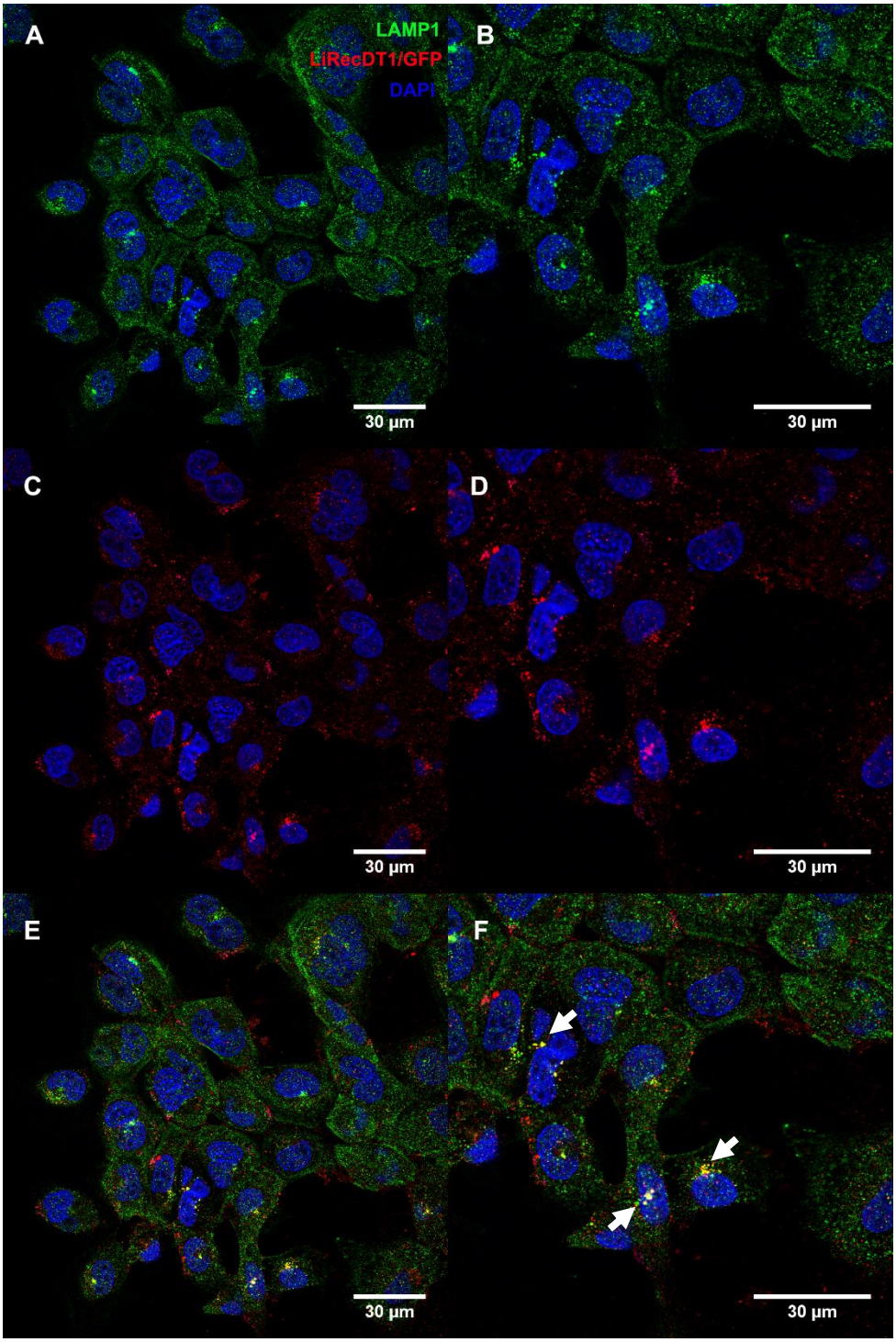
FIGURA 35 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 30 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 30 minutos de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A proteína LAMP2, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho.

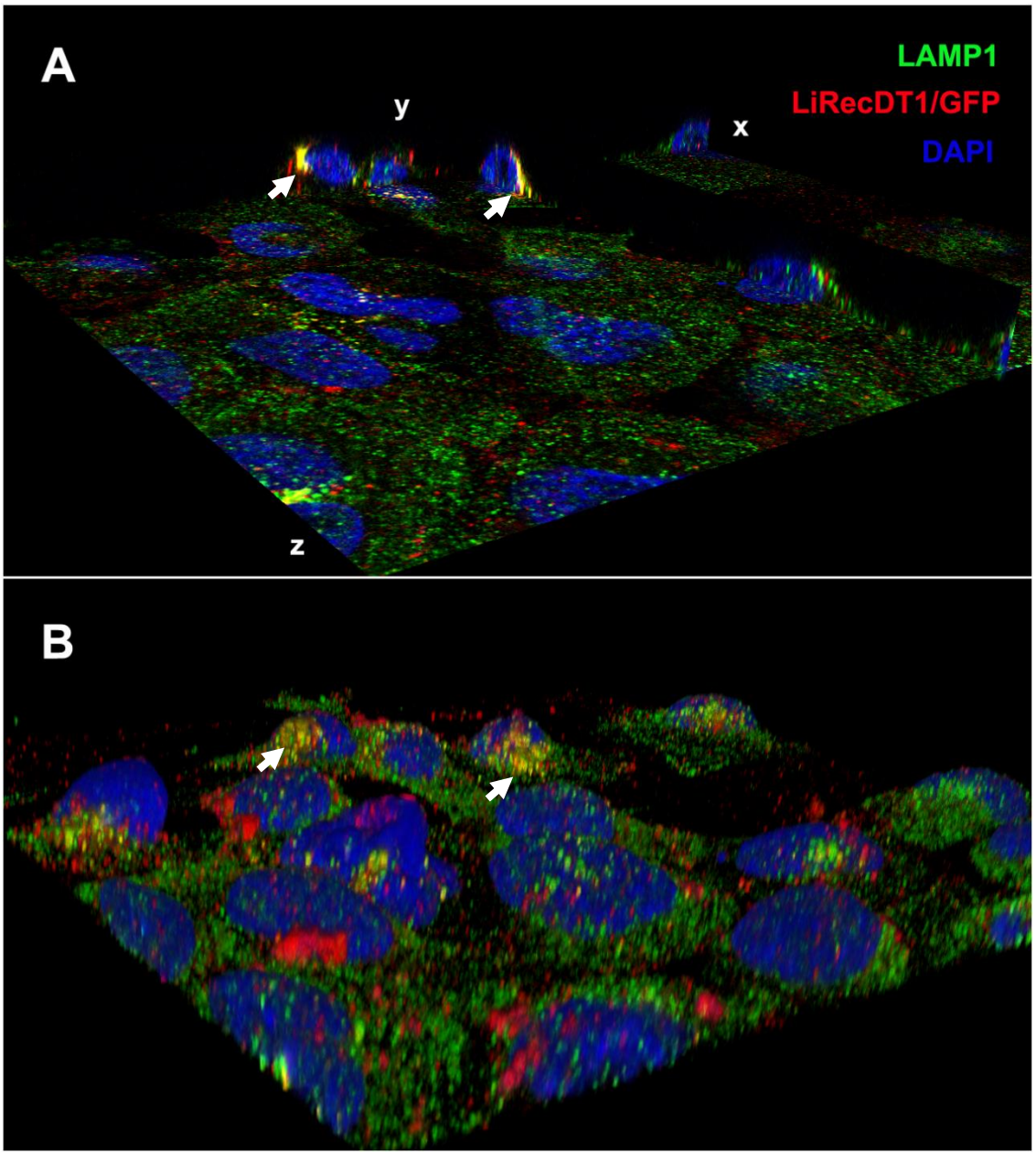
Contudo, a observação realizada após 1 hora de exposição à toxina recombinante demonstrou que uma fração da LiRecDT1/GFP que interage com as células apresenta co-localização com vesículas marcadas por LAMP1, como observado pela co-localização de ambas as proteínas caracterizada pela coloração amarela/laranja. Este resultado indica que a toxina recombinante aparentemente foi endocitada e endereçada para o sistema endossomo/lisossomo (Figura 36 – E e F). Ainda, as projeções ortogonal e tridimensional evidenciaram que os pontos de co-localização das duas proteínas se encontram dentro da célula, em vesículas perinucleares (Figura 37 – A e B). No entanto, o mesmo perfil de co-localização não foi verificado quando as células foram marcadas com anticorpos que reconhecem LAMP2 (Figura 38 – E e F), mesmo quando visualizadas nas projeções ortogonal e tridimensional (Figura 39 – A e B).

FIGURA 36 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1.



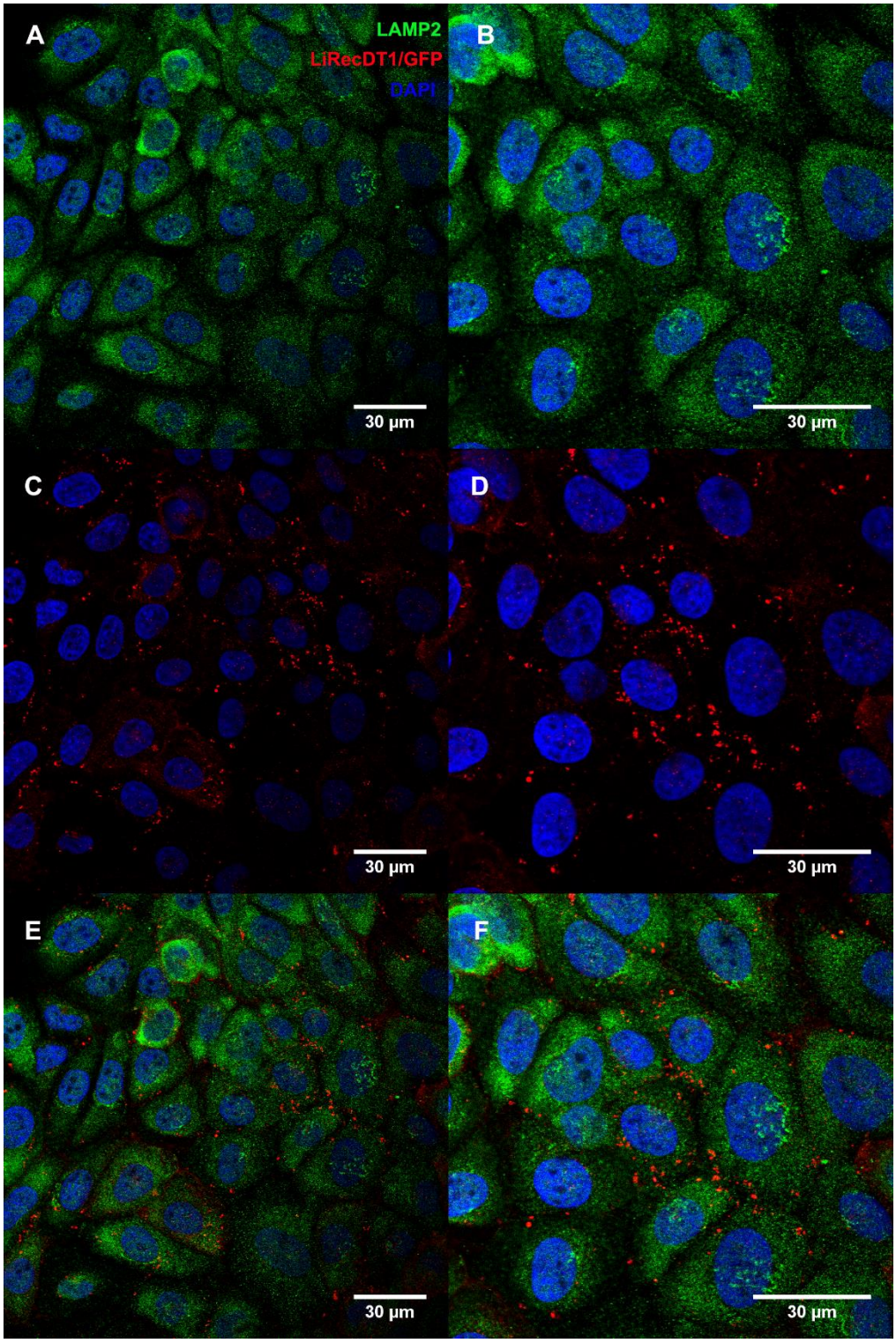
Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 1 hora de exposição à toxina. A proteína LAMP1, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a LAMP1 caracterizando o sistema endossomo/lisossomo são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1025x (B, D, e F).

FIGURA 37 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



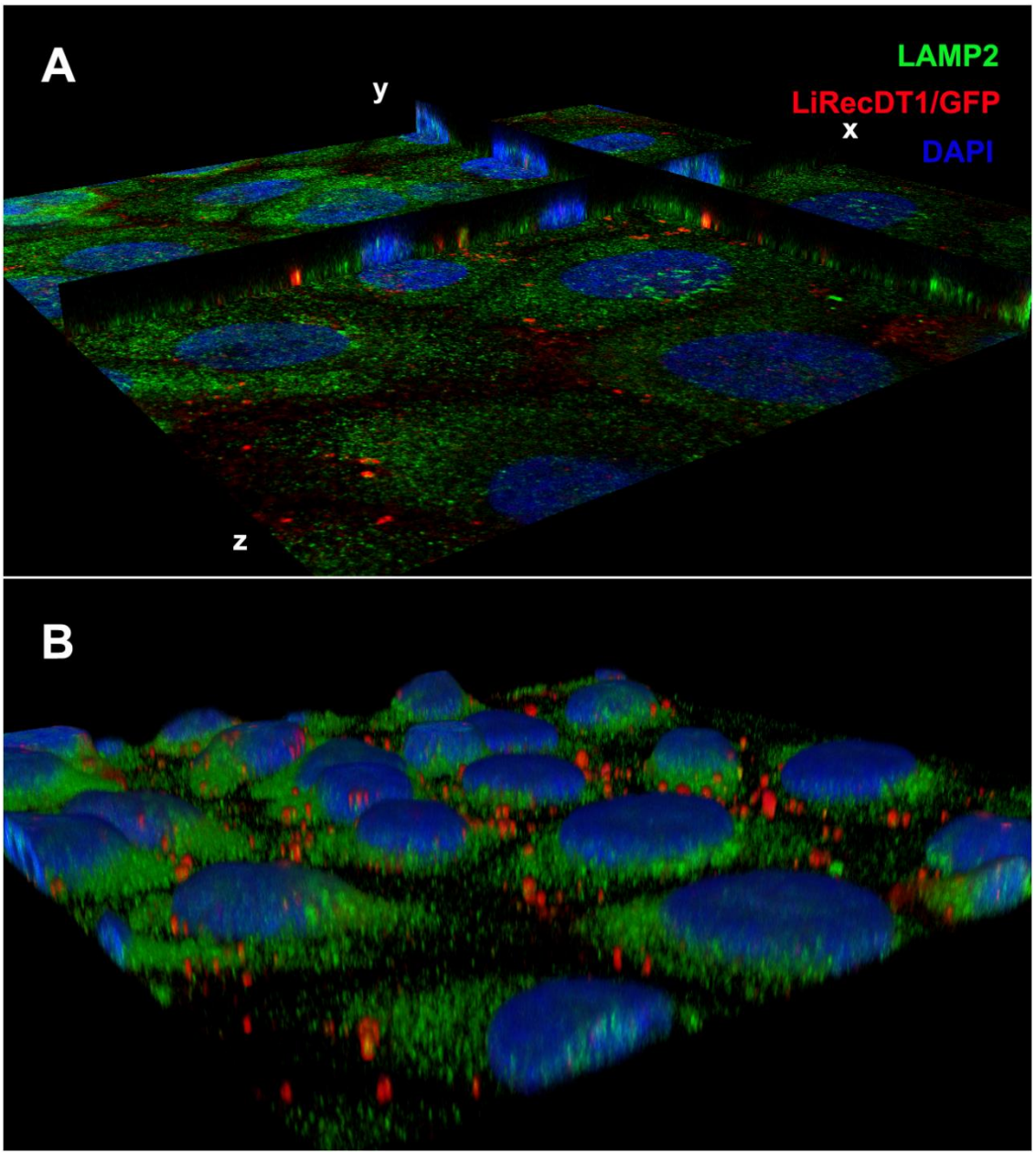
(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 1 hora de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A proteína LAMP1, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a LAMP1 caracterizando o sistema endossomo/lisossomo são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas.

FIGURA 38 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 1 hora de exposição à toxina. A proteína LAMP2, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1025x (B, D, e F).

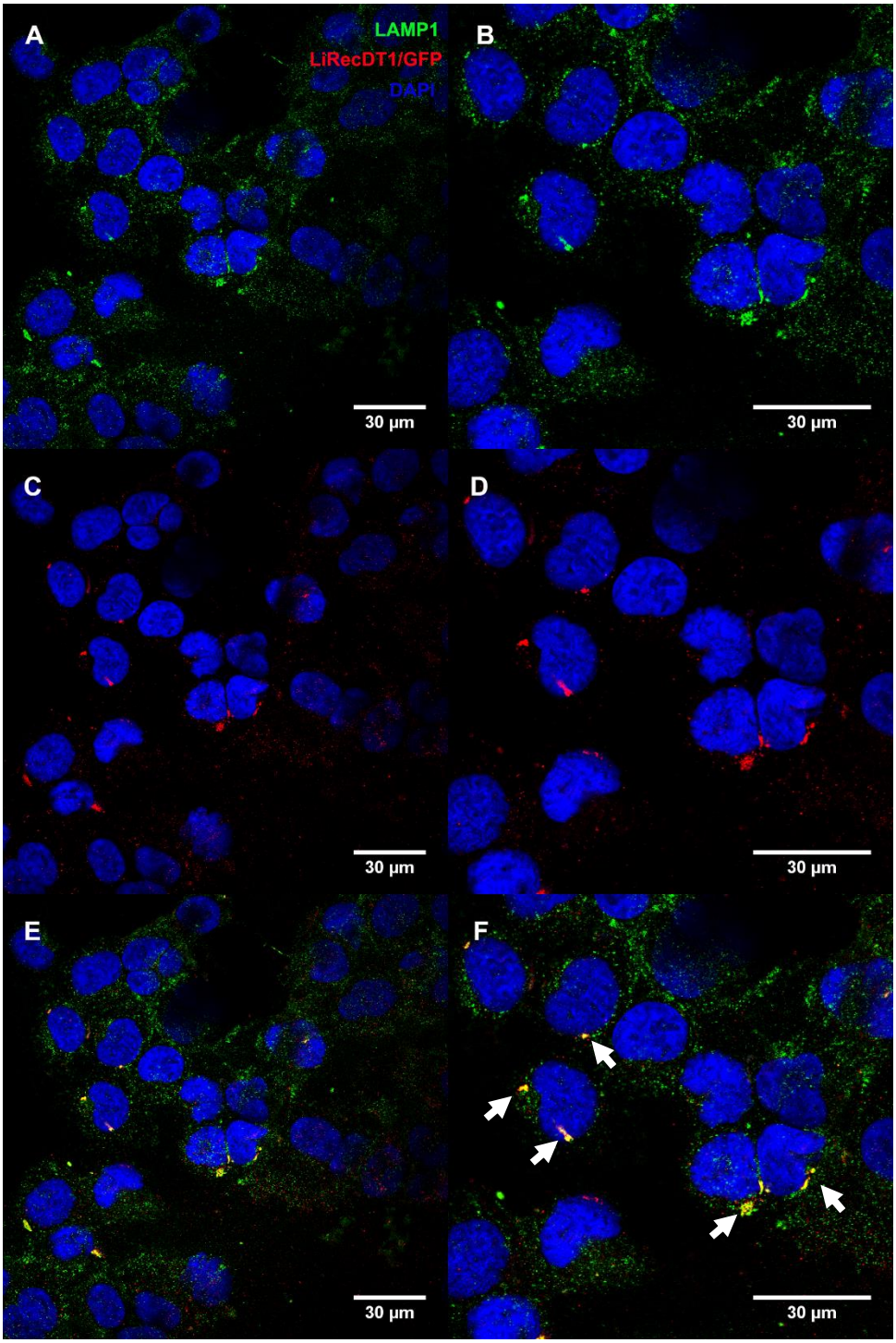
FIGURA 39 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 1 hora de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A proteína LAMP2, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho.

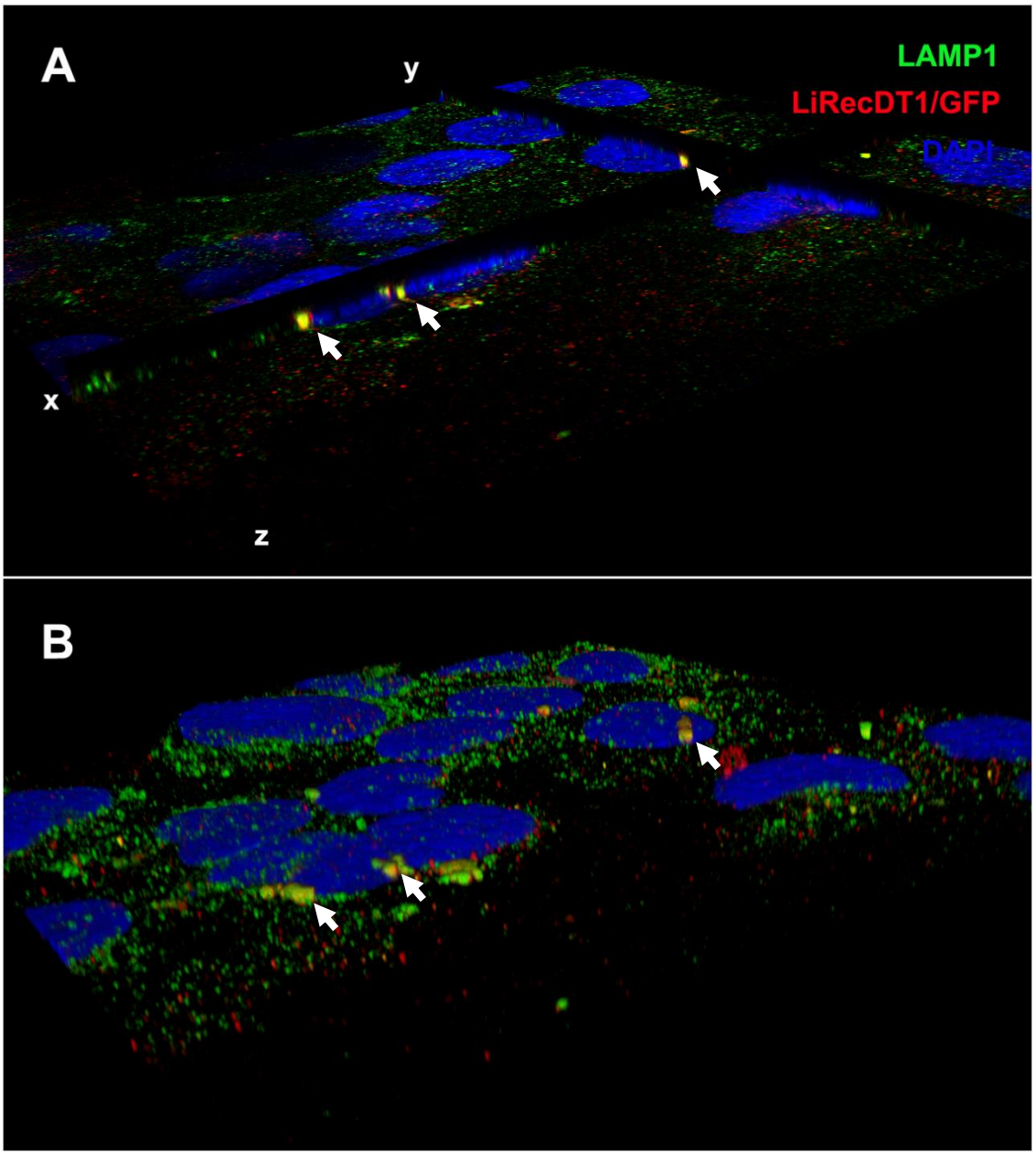
Já na observação realizada após 4 horas de exposição à toxina recombinante, foi possível observar que a LiRecDT1/GFP apresenta co-localização com vesículas marcadas por anticorpos que reconhecem LAMP1 (Figura 40 – E e F) e LAMP2 (Figura 42 – E e F), como observado pela co-localização de ambas as proteínas caracterizada pela coloração amarela/laranja. Este evento é melhor visualizado nas projeções ortogonal e tridimensional, evidenciando a presença da toxina recombinante em vesículas no interior da célula (Figuras 40 – A e B, e 43 – A e B). Desta forma, pode-se verificar que, em sua maioria, a toxina recombinante foi endocitada e endereçada para o sistema endossomo/lisossomo. Em resumo, os resultados obtidos até então apontam para o fato de que a toxina recombinante interage com a membrana plasmática de células da linhagem RAEC, especificamente com regiões caracterizadas por *lipid rafts*, e são endocitadas via cavéolas, sendo por sua vez endereçada à compartimentos do sistema endossomo/lisossomo.

FIGURA 40 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1.



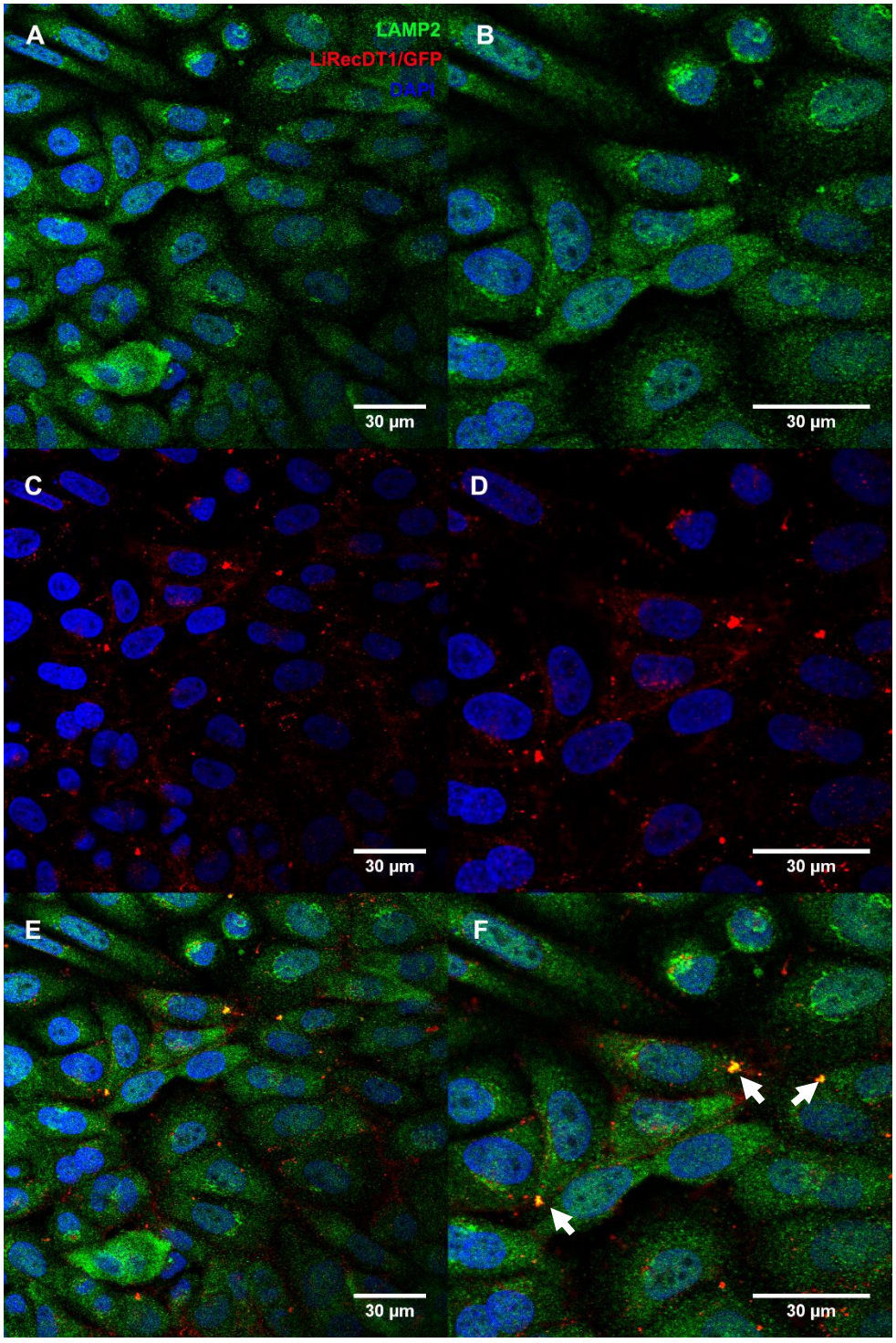
Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 4 horas de exposição à toxina. A proteína LAMP1, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a LAMP1 caracterizando o sistema endossomo/lisossomo são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1025x (B, D, e F).

FIGURA 41 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP1 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



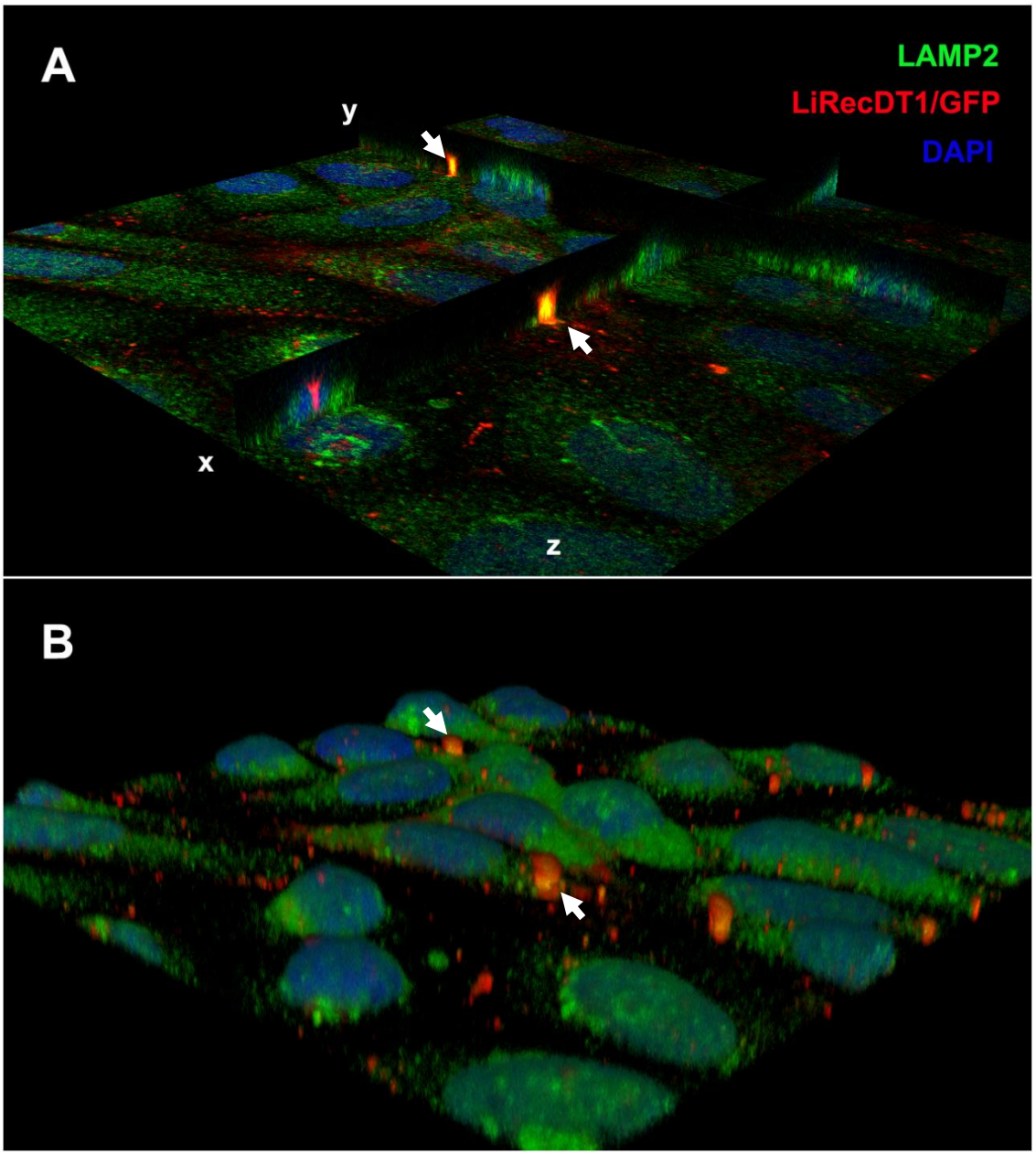
(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 4 horas de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A proteína LAMP1, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a LAMP1 caracterizando o sistema endossomo/lisossomo são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas.

FIGURA 42 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2.



Células RAEC foram expostas à LiRecDT1/GFP (50 µg/mL) e observadas após 4 horas de exposição à toxina. A proteína LAMP2, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde (A e B). A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho (C e D). A sobreposição dos paineis “A” e “C”, “B” e “D” é visualizada nos paineis “E” e “F”, respectivamente. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a LAMP2 caracterizando o sistema endossomo/lisossomo são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas. Aumento de 630x (A, C, e E) e 1025x (B, D, e F).

FIGURA 43 – INTERNALIZAÇÃO DA LIRECDT1/GFP E ENDEREÇAMENTO PARA COMPARTIMENTOS DO SISTEMA ENDOSSOMO/LISOSSOMO DE CÉLULAS RAEC APÓS 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO À TOXINA – MARCAÇÃO PARA LAMP2 – PROJEÇÕES ORTOGONAL E TRIDIMENSIONAL.



(A) Projeção ortogonal das células RAEC expostas à LiRecDT1/GFP após 4 horas de exposição à toxina evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção dos eixos x, y e z. (B) Representação tridimensional da projeção ortogonal evidenciando a região de interação da toxina com as células visualizada através da projeção do volume celular. A proteína LAMP2, representando vesículas do sistema endossomo/lisossomo, foi observada pela marcação em verde. A LiRecDT1/GFP foi observada pela marcação em vermelho. Os pontos de co-localização da LiRecDT1/GFP com a LAMP2 caracterizando o sistema endossomo/lisossomo são visualizados pela cor amarela/laranja, apontados pelas setas.

7.0 DISCUSSÃO

Tendo em vista a relevância da presença de fosfolipases-D como componentes do veneno loxoscélico no contexto do envenenamento, análises voltadas ao estudo da citotoxicidade destas toxinas *in vitro* e *in vivo* têm sido realizadas com o intuito de compreender em nível molecular os mecanismos pelos quais estas toxinas agem. Isoformas recombinantes destas toxinas têm sido expressas e obtidas na condição solúvel e com atividade biológica demonstrada (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; APPEL *et al.*, 2008; CATALAN *et al.*, 2011; CHAIM *et al.*, 2011a; VUITIKA *et al.*, 2013). Tanto nas formas nativas como recombinantes, as fosfolipases-D podem induzir experimentalmente dermonecrose (APPEL *et al.*, 2008; DE SANTI FERRARA *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011a; MAGALHAES *et al.*, 2013), resposta inflamatória (PALUDO *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011a), agregação plaquetária (RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008; MAGALHAES *et al.*, 2013), hemólise (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CATALAN *et al.*, 2011; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; MAGALHAES *et al.*, 2013), aumento da permeabilidade vascular (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008), nefrotoxicidade (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008) e efeitos citotóxicos em células de rim canino (MDCK) (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Devido ao fato de que o endotélio é alvo de toxinas do veneno e representa uma interface entre os eventos associados ao loxoscelimo cutâneo e o loxoscelismo sistêmico, como já explorado em alguns trabalhos na literatura (VEIGA *et al.*, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002; PALUDO *et al.*, 2006), células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) foram utilizadas como modelo celular para simular a estrutura do endotélio. É importante ressaltar a importância do estudo da resposta de células endoteliais frente à exposição a toxinas, visto que estas são extremamente responsivas e estão entre os primeiros tipos celulares a entrar em contato com patógenos e moléculas endógenas associadas ao dano tecidual (OPITZ *et al.*, 2009).

A fim de avaliar a interação das fosfolipases-D com a membrana de células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) e, consequentemente, buscar evidências da sua citotoxicidade da mesma sobre estas células,

primeiramente as isoformas LiRecDT1, LiRecDT1/H12A e LiRecDT1/GFP foram obtidas através da expressão em cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e purificação por cromatografia de afinidade (Figura 8). Após a purificação, as proteínas foram obtidas com grau de pureza, de forma semelhante à Chaim e colaboradores (2006, 2011a), possibilitando a sua utilização das mesmas para ensaios bioquímicos e biológicos.

No entanto, o primeiro passo a ser realizado após a obtenção das isoformas de fosfolipases-D recombinantes é a avaliação das mesmas quanto à sua atividade enzimática; uma vez que enzimas recombinantes podem não assumir o dobramento correto e portanto ter a atividade afetada. Assim, a fim de avaliar a atividade esfingomielinásica do veneno, das isoformas LiRecDT1, LiRecDT1/H12A, e LiRecDT1/GFP obtidas, foi realizado um ensaio fluorimétrico por meio da detecção indireta da colina. O uso do reagente Amplex Red é amplamente citado na literatura devido à sua alta sensibilidade e eficiência em detectar a hidrólise de fosfolipídeos e esfingolipídeos (KATO *et al.*, 2005; MORENO-GARCIA *et al.*, 2005).

Estudos recentes têm demonstrado a grande reprodutibilidade do ensaio com o reagente Amplex Red para determinar a atividade de fosfolipases de diversos tipos celulares, como bactérias, fungos, aranhas e até mesmo de células humanas (SCHONBERGER *et al.*, 2014; LAJOIE e CORDES, 2015; ESNAULT *et al.*, 2017). Após 1 hora de reação, foi possível determinar a atividade do veneno e das toxinas recombinantes significativamente superior ao controle negativo (PBS). Contudo, a isoforma mutada apresenta atividade residual aproximadamente 4 vezes inferior à isoforma original (Figura 9). Estes dados corroboram os já obtidos por outros autores (CHAIM *et al.*, 2011a; VUITIKA *et al.*, 2013; WILLE *et al.*, 2013) e validam as enzimas para o uso em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Vale ressaltar que a comparação entre toxina ativa e toxina mutada tem o intuito de observar quais efeitos são dependentes ou não da atividade fosfolipásica.

A fim de verificar alterações morfológicas nas células RAEC decorrente da ação das isoformas LiRecDT1 e LiRecDT1/H12A, estas foram expostas às toxinas em diferentes intervalos de tempo. Após 1 hora de exposição, foi possível verificar que apenas as células expostas ao veneno de *L. intermedia* apresentaram morfologia arredondada, com perda de “espraiamento”, indicando

a desadesão da matriz extracelular (Figura 10). No entanto, as células expostas às toxinas recombinantes não apresentaram alterações se comparadas ao controle negativo (PBS).

O resultado obtido com o veneno corrobora dados obtidos por outros autores, já foi verificada a desadesão de células endoteliais da matriz extracelular quando expostas ao veneno de *L. intermedia*, sendo esta atividade atribuída ao efeito sinérgico das toxinas, em especial, da ação de metaloproteases e hialuronidases do veneno sobre componentes da matriz extracelular (VEIGA *et al.*, 2000b; NOWATZKI *et al.*, 2012; FERRER *et al.*, 2013). Já a fosfolipase-D isoladamente não induz perda de adesão celular tão pronunciada quando comparado ao veneno total (CHAIM *et al.*, 2011a). No entanto, após 1 hora de exposição à LiRecDT1, foi possível observar a presença de algumas células com morfologia arredondada e formação de vacúolos citoplasmáticos, sendo este efeito também observado após 2 horas (Figuras 11 e 12). Estes eventos foram mais evidentes nas células expostas à toxina após 4 horas, sendo também observados após 6 e 24 horas (Figuras 13, 14, e 15).

Dados não mostrados, obtidos por meio de projeto de colaboração (DEBONI, 2017), demonstraram que ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular por azul de tripan e vermelho neutro não revelaram comprometimento da membrana plasmática, o que sugeriria um efeito distinto daquelas toxinas formadoras de poro, por exemplo, as quais se associam à membrana geralmente via receptores, e então se inserem na membrana, formando um poro e permeabilizando a mesma (ZITZER *et al.*, 1997; IACOVACHE *et al.*, 2010; KITADOKORO *et al.*, 2011). Entretanto, a análise da viabilidade das células endoteliais expostas às toxinas pelo ensaio de MTT, evidenciou que, após 2 e 24 horas de exposição à toxina LiRecDT1, houve redução da atividade de desidrogenases mitocondriais, sendo este efeito mais pronunciado conforme o aumento da concentração de toxina ativa utilizada. Tal fato sugere que há um efeito citotóxico não necessariamente associado à morte celular (BERRIDGE e TAN, 1993; RISS *et al.*, 2004; DIERS *et al.*, 2013). Desta forma, os efeitos da LiRecDT1 sobre células endoteliais são sutis, sugerindo que a toxina está promovendo citotoxicidade celular por alterações metabólicas, e não por simples permeabilização ou rompimento da membrana plasmática.

Em relação a outras toxinas, foi demonstrado que a toxina vacuolizante da bactéria *Heliobacter pylori* (VacA) é capaz de induzir a vacuolização de células de diferentes linhagens ao interagir com a membrana plasmática das mesmas. Sabe-se ainda que esta toxina se liga à *lipid rafts,* e na presença de uma droga que remove o colesterol da membrana e desestabiliza estes microdomínios, a toxina VacA não é capaz de promover vacuolização (RICCI *et al.*, 2000). Ainda não se sabe exatamente por quais vias esta toxina exerce sua citotoxicidade, porém, sabe-se que a mesma se insere nas membranas plasmática e endossomais, formando poros e permeabilizando as mesmas, levando a eventos como despolarização da membrana plasmática, fragmentação mitocondrial, formação de espécies reativas de oxigênio, e apoptose (RASSOW e MEINECKE, 2012).

Outro estudo revelou que a toxina autotransportadora secretada (Sat), uma serino-protease da bactéria *Escherichia coli*, é capaz de induzir citotoxicidade em linhagens de células epiteliais renais e de bexiga humanas. Sabe-se que a Sat hidrolisa a proteína foldrina, a qual promove a ligação de filamentos de actina à membrana plasmática. A degradação desta proteína pode levar à alterações morfológicas e citotoxicidade decorrentes da desadesão celular oriundas da reorganização do citoesqueleto (MARONCLE *et al.*, 2006). Além disso, foi verificado que, após 1 hora de incubação com a toxina, as células apresentam formação de vacúolos citoplasmáticos, indicando citotoxicidade, e a progressão deste efeito é observada ao longo do tempo (GUYER *et al.*, 2002), assim como ocorre com a LiRecDT1 utilizada neste trabalho. Em relação a fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles*, em um trabalho anterior foram demonstrados efeitos citotóxicos semelhantes aos obtidos neste trabalho ao expor células da linhagem RAEC à LiRecDT1, porém, apenas a presença de vacuolização no citoplasma de algumas células foi evidenciada. Ainda, os autores sugerem que estes eventos estejam associados à geração de segundo mensageiros como metabólitos lipídicos (CHAIM *et al.*, 2011a).

A vacuolização intracelular é também demonstrada para outras moléculas de caráter não proteico. A citotoxicidade sobre células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) induzida por nanomateriais, como nanotubos de carbono e nanoesferas de carbono, assim como pela arecolina (alcalóide vegetal), demonstraram que a presença de vacúolos citoplasmáticos e redução

de volume celular indica um grau de citotoxicidade, mesmo que as células ainda permaneçam viáveis. Ainda, sugere-se a hipótese de que estes eventos estejam associados à formação de autofagossomos ou estresse oxidativo, sendo estas respostas adaptativas que podem levar à morte celular e/ou indução de inflamação (YAMAWAKI e IWAI, 2006; GUO *et al.*, 2011; ULLAH *et al.*, 2014).

É postulado que a atividade das fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles* pode se dar pela hidrólise de ligações fosfodiéster ou ainda pela transfosfatidilação de diferentes substratos lipídicos, os quais são componentes das membranas celulares. Dentre esta variedade de 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, sendo esta última considerada biologicamente inerte (LEE e LYNCH, 2005; LAJOIE *et al.*, 2013).

Uma vez que a LiRecDT1 é capaz de se ligar à membrana plasmática e hidrolisar esfingomielina e gerar como subprodutos lipídeos bioativos, sugere-se que além de promover a citotoxicidade, esta toxina esteja relacionada também a processos inflamatórios, uma vez que estes mediadores podem gerar uma cascata de sinalização que leva à secreção de citocinas e por sua vez ao recrutamento de leucócitos (CHALFANT e SPIEGEL, 2005; CHAIM *et al.*, 2011a).

Reforçando a hipótese de que as fosfolipases-D do veneno loxoscélico induzem a resposta inflamatória decorrentes de cascatas de sinalização intracelulares, um estudo utilizando a fosfolipase-D recombinante de *L. reclusa* demonstrou que, após expor fibroblastos humanos à toxina, foi verificado o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1B, CCL5, CXCL-1, CXCL-2 e TNF-α (DRAGULEV *et al.*, 2007). Dentre os eventos relacionados à ceramida-1-fosfato, sabe-se que a mesma está também relacionada à regulação de processos inflamatórios. A C1P interage com o domínio N-terminal CaLB da fosfolipase-A2 citosólica, promovendo a sua ativação e levando à liberação de ácido araquidônico (PETTUS *et al.*, 2004; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005; WIJESINGHE *et al.*, 2010) e subsequente formação de prostaglandinas (VEIGA *et al.*, 2001a; PETTUS *et al.*, 2003; SIMANSHU *et al.*, 2013; MACEYKA e SPIEGEL, 2014).

Além disso, acredita-se que a C1P possa agir como um precursor e pode ser metabolizada à esfingosina-1-fosfato (S1P), a qual estimula a atividade da enzima cicloxigenase 2 (COX-2), utilizando por sua vez o ácido araquidônico produzido pela fosfolipase-A2 como substrato para a produção de prostaglandinas (PETTUS *et al.*, 2005; SIMANSHU *et al.*, 2013; NAKAMURA e MURAYAMA, 2014; RIVERA *et al.*, 2015). Além disso, o LPA formado a partir da ação das fosfolipases-D do veneno pode se ligar a receptores acoplados à proteína G, conhecido como LPARs, e ativar vias de sinalização associadas à MAPK ou ERK1/2, estimulando a expressão de mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas, mitógenos e fatores pró-angiogênicos (VAN MEETEREN *et al.*, 2004; DURGAM *et al.*, 2006; YUNG *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014; STODDARD e CHUN, 2015). Ainda, foi demonstrado que o veneno e uma fosfolipase-D de *L. arizonica* produzem ceramida-1,3-fosfato cíclica e ácido fosfatídico cíclico a partir da esfingomielina e lisofosfatidilcolina, respectivamente. Estes mediadores estão associados à regulação da proliferação celular, apoptose, e inflamação, por meio da inibição de receptores do tipo PPAR, bem como à perda da assimetria da membrana plasmática, induzindo alterações na integridade e morfologia da mesma, podendo contribuir para os efeitos citotóxicos do veneno e das fosfolipases-D presentes no mesmo (STOCK *et al.*, 2012; LAJOIE *et al.*, 2013; TSUKAHARA, 2013).

Além da geração de mediadores lipídicos bioativos como os supracitados, uma vez que lipídeos da membrana plasmática, como a esfingomielina, são substratos para a LiRecDT1 (Figura 9), postulou-se que esta toxina poderia interagir com regiões de *lipid rafts.* Ainda, foi mostrado por *lipid blot* que a toxina recombinante possui afinidade por diversos elementos de *lipid rafts* (CHAIM *et al.*, 2011a). Estes microdomínios, os quais são enriquecidos em esfingomielina e colesterol, funcionam como plataformas dinâmicas que exercem papéis cruciais em diversos processos celulares, como modulação da transdução de sinais, organização do citoesqueleto, adesão celular e migração e seleção de lipídios e proteínas para diferentes membranas (MUNRO, 2003; CHIANTIA e LONDON, 2013).

Visando comprovar a hipótese de que as fosfolipases-D de *L. intermedia* interagem com regiões de *lipid rafts*, técnicas de microscopia foram realizadas com intuito de evidenciar alvos moleculares típicos da rota de endocitose via

cavéolas, uma vez que estas estruturas são abundantes em células endoteliais e estão associadas à endocitose e modulação de processos de sinalização celular, uma vez que estas concentram receptores associados à proteína G, proteínas ligadoras a GTP da família Ras, canais ionicos (SONG *et al.*, 1996; INSEL *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; SOWA, 2012).

Os resultados obtidos por meio da microscopia confocal revelaram que a LiRecDT1/GFP se liga à superfície das células da linhagem RAEC após 30 minutos de incubação, porém, não foi observada co-localização da toxina recombinante com as regiões de *lipid rafts* caracterizadas pela presença da proteína caveolina-1 (Figuras 18 e 19). A interação da toxina com as *lipid rafts* é observada apenas após 1 hora de incubação (Figuras 20 e 21), sendo este evento mais evidente após 4 horas (Figuras 22 e 23), caracterizando uma interação tempo-dependente. Estes dados são corroborados pela microscopia TIRF, onde a utilização de um segundo marcador para *lipid rafts* (toxina colérica CT-B) foi empregada, e permitiu a visualização da co-localização da LiRecDT/GFP após 1 e 4 horas de exposição à toxina (Figuras 25 e 26).

Os dados obtidos pela microscopia TIRF foram importantes para confirmar a presença da toxina recombinante na membrana plasmática e a subsequente reorganização das *lipid rafts*. Isto porque o princípio da técnica é baseado incidência do laser em uma angulação tal que permite a reflexão total do mesmo e a subsequente criação de uma onda evanescente, formada na interface formada pela lamínula e pela membrana plasmática. Desta maneira, esta onda se propaga no máximo 100 nm em direção à amostra, excitando os fluoróforos presentes apenas nesta região, evidenciando eventos que ocorrem principalmente na membrana plasmática.

Corroborando estes resultados, estudos anteriores revelaram que toxinas do veneno de *L. intermedia* e a isoforma recombinante LiRecDT1 interagem com a membrana de diferentes tipos celulares. Células da linhagem RAEC foram expostas à LiRecDT1 por 4 horas e, após imunomarcação com anticorpos específicos que reconhecem a toxina recombinante, foi possível observar a ligação da mesma na membrana plasmática, porém, sem a especificação de domínios de membrana, como *lipid rafts* (CHAIM *et al.*, 2011a). Em outro estudo, foi observado que a LiRecDT1, além de promover a hemólise, se liga à membrana plasmática e promove a reorganização de *lipid rafts* de eritrócitos

humanos após 8 horas de exposição à toxina, sendo que este evento não é demonstrado com a toxina mutada LiRecDT1/H12A, sugerindo que a atividade enzimática destas toxinas é importante para a modulação destes microdomínios de membrana (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a agregação de *lipid rafts* resultantes da interação da LiRecDT1/GFP com as mesmas está aparentemente associada à sua atividade enzimática, uma vez que após 30 minutos de exposição à toxina, esta se apresenta ligada à membrana plasmática, porém, apenas após 1 hora e 4 horas existe a agregação dos microdomínios, sugerindo que a atividade enzimática da LiRecDT1 sobre a membrana pode ativar mecanismos moleculares que levam à reorganização das *lipid rafts*.

A interação de toxinas de diversos organismos com a membrana plasmática de células, especificamente domínios caracterizados por *lipid rafts*, é bem descrita na literatura. A toxina VacA de *H. pylori,* por exemplo, antes de exercer sua atividade sobre a membrana plasmática de diferentes tipos celulares, depende da estrutura de *lipid rafts* para se ligar à membrana. Uma vez que as células são expostas à metil-β-ciclodextrina, droga amplamente utilizada para remover o colesterol da membrana, a ligação da toxina VacA a estes microdomínios é significantemente reduzida, assim como a atividade da mesma, sugerindo que a interação da toxina com os domínios caracterizados por *lipid rafts* é dependente da rigidez da membrana (PETERSEN *et al.*, 2001; KUO e WANG, 2003).

A toxina Shiga, da bactéria *Shigella dysenteriae*, diferentemente da toxina VacA que se liga à membrana via colesterol, interage com o a região formada por carboidrato do glicolipídeo Gb3. Este glicolipídeo, presente em diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, estão alocados em *lipid rafts* (LING *et al.*, 1998; BAUWENS *et al.*, 2013; SANDVIG *et al.*, 2014). Ainda, não somente a densidade de Gb3 é importante para a ligação da toxina Shiga à membrana, mas também do colesterol, uma vez que é postulado que esta molécula promove uma dobra no carboidrato do glicolipídeo Gb3, diminuindo a exposição dos sítios de ligação da toxina ao Gb3, assim desfavorecendo a ligação da toxina ao mesmo (YAHI *et al.*, 2010; LINGWOOD *et al.*, 2011). Isto foi comprovado uma vez que a ligação da toxina Shiga a celulas expostas à metil-β-ciclodextrina foi aumentada (MAHFOUD *et al.*, 2010).

A toxina da bactéria *Vibrio cholerae* é outro exemplo de interação de toxinas com a superífice celular, especificamente regiões de *lipid rafts*. A subunidade β desta toxina, conhecida como CT-B, se liga ao gangliosídeo GM1, presente principalmente nestes microdomínios (CHINNAPEN *et al.*, 2007; MARGHERI *et al.*, 2014). O colesterol, assim como ocorre com a toxina Shiga, também é importante para a ligação da CT-B à membrana, de modo que, ao ser realizada a extração do colesterol por meio da metil-β-ciclodextrina, a ligação da CT-B ao gangliosídeo GM1 é mais evidente (SANDVIG *et al.*, 2004).

Em relação à LiRecDT1, ainda não existem evidências de que a interação com microdomínios formados por *lipid rafts* é dependente de sua atividade enzimática ou da presença de colesterol nestes domínios, porém, células expostas à LiRecDT1 promoveram a redistribuição de *lipid rafts* contendo GM1, bem como houve diferença na localização da toxina, sendo esta agregada quando ativa (CHAIM *et al*., 2008).

Com os resultados obtidos é possível afirmar que a toxina liga-se à membrana, co-localiza com *lipid rafts* contendo GM1 e caveolina-1, e o evento é tempo-dependente no contexto de reorganização destes microdomínios, visualizada pelos agregados detectados. Entretanto, se essa interação é favorecida ou não pela característica físico-química da membrana, estudos futuros envolvendo o uso da droga metil-β-ciclodextrina serão essenciais para elucidar os mecanismos pelos quais as fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles* interagem com domínios específicos da membrana plasmática. Da mesma forma, a toxina recombinante mutada deve ser utilizada como ferramenta na forma de proteína fusionada à GFP, uma vez que a estratégia de marcação da toxina com o fluoróforo BODIPY não teve sucesso em decorrência de prejudicar a atividade esfingomielinásica e não apresentar a mesma qualidade de fluorescência observados para a LiRecDT1/GFP. Portanto, ainda não é possível afirmar, embora existam indícios, que a atividade enzimática é crucial para a ligação da toxina às *lipid rafts*.

Além da microscopia confocal e TIRF, buscando confirmar por meio de uma terceira metodologia a interação da LiRecDT1 com microdomínios formados por *lipid rafts*, bem como buscar possíveis parceiros moleculares associados à toxina, que indicariam rotas de sinalização moduladas pela mesma, foi utilizada a técnica de fracionamento do extrato celular por ultracentrifugação em gradiente

de sacarose. No entanto, foi possível apenas realizar a padronização do perfil do fracionamento, onde as proteínas caveolina-1 e flotilina-1, ambas presentes em *lipid rafts*, foram visualizadas nas frações 5 e 6 do gradiente (Figura 27). Ambas as proteínas são amplamente utilizadas como marcadores clássicos para a identificação destes microdomínios, sendo ambas visualizadas com massa molecular aproximada de 21 kDa para a caveolina-1, e 47 kDa para a flotilina-1 (SIMONS e IKONEN, 1997; BROWMAN *et al.*, 2006; SPRENGER *et al.*, 2006; LINGWOOD *et al.*, 2009).

Diversos estudos empregam o uso de fracionamento de extrato celular por gradiente de sacarose como metodologia para o isolamento de membranas resistentes à detergente (do inglês *Detergent Resistent Membrane* - DRM) e utilizam as proteínas supracitadas como marcadores de *lipid rafts* (BROWMAN *et al.*, 2006; SPRENGER *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2007; LINGWOOD *et al.*, 2009). Corroborando os dados presentes na literatura, é possível afirmar que através da visualização das bandas representando a caveolina-1 e flotilina-1 nas frações 5 e 6, o isolamento de frações ricas em DRM foi bem sucedido.

Alternativas ao uso do detergente Triton X-100 para a separação de *lipid rafts* são utilizadas e podem se tornar opções ao uso deste detergente. Ao realizar a separação destes microdomínios, por exemplo, foi verificado que ao fracionar *lipid rafts* de células de ovário de hamster chinês, (linhagem CHO), a melhor opção de detergente a ser utilizado foi o Lubrol WX (RIDDELL *et al.*, 2001). Ainda, ao comparar diversos detergentes no processo de isolamento de *lipid rafts* de células de rim canino (linhagem MDCK), os autores verificaram que os detergentes Brij 58, Tween-20, e Lubrol WX produziram DRMs com cerca de 10 vezes mais proteínas se comparado com as DRMs obtidas com Triton X-100 (SCHUCK *et al.*, 2003). Contrariamente, também utilizando células da linhagem MDCK, outros autores verificaram que a melhor opção de detergente a ser utilizado foi o Triton X-100 (DELAUNAY *et al.*, 2008). Desta forma, a literatura ainda se apresenta controversa em relação ao uso de detergentes para o isolamento de DRMs.

Mesmo com a variedade de alternativas de detergentes, o uso do detergente Triton X-100 se mostrou eficiente para o isolamento de *lipid rafts* de células endoteliais. Em uma análise proteômica de frações obtidas após o isolamento de DRMs de células endoteliais de aorta humana por

ultracentrifugação em gradiente de sacarose, os autores empregaram o detergente Triton X-100, o qual permitiu a visualização de diferentes proteínas de *lipid rafts*, como a caveolina-1 e flotilina-1, por exemplo (GUO *et al.*, 2011). Ainda, ao realizar uma análise proteômica quantitativa de proteínas reguladas por caveolina-1 em *lipid rafts* de células endoteliais de pulmão de camundongos, os autores também fizeram uso de Triton X-100 no processo de isolamento destes microdomínios, o qual foi eficiente para de separação dos mesmos (DAVALOS *et al.*, 2010). Desta forma, o uso de Triton X-100 como detergente para o isolamento de DRMs de células endoteliais da linhagem RAEC é provavelmente é uma das melhores alternativas a ser empregada, porém, a utilização de outros detergentes se torna viável tendo em vista a visualização não somente de proteínas como caveolina-1 e flotilina-1, mas também da LiRecDT1, a qual estaria presente em menor concentração nas DRMs, se comparado com outras proteínas de *lipid rafts*.

Além do isolamento de DRMs por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, foi realizada a padronização da técnica de HPTLC com o intuito de visualizar o perfil lipídico das frações enriquecidas em *lipid rafts* e não enriquecidas em *lipid rafts*. Até então, a literatura apresenta dados sobre a composição lipídica da membrana plasmática de células endoteliais cultivadas *in vitro*, mas não de *lipid rafts* (RASTOGI e NORDOY, 1980; BENISTANT *et al.*, 1995; CANSELL *et al.*, 1997; CHAIM *et al.*, 2011a). Especificamente, ao avaliar a composição lipídica do extrato celular total de células endoteliais humanas da linhagem EA.hy192, foi demonstrado por HPTLC que, em diferentes estágios de cultivo, as células apresentam diferenças na composição lipídica. Na fase de crescimento e em confluência, por exemplo, estas células apresentam cerca de 55% de fosfatidilcolina, seguida de aproximadamente 20% de esfingomielina e 25% de outros lipídeos. Já quando cultivadas na ausência de soro fetal bovino, como realizado neste estudo, a composição de fosfatidilcolina é de aproximadamente 29%, e esfingomielina 34% (CANSELL *et al.*, 1997). Estes dados reforçam a hipótese de que a abundância de esfingomielina na membrana destas células durante a privação de nutrientes se tornam mais suscetíveis à interação da LiRecDT1 com seu susbtrato. Além disso, uma vez que a LiRecDT1 interage diretamente com *lipid rafts* de células endoteliais, a análise da

composição lipídica destes microdomínios, e a possível alteração da mesma devido à ação/interação com a LiRecDT1, fez-se necessária.

Os resultados obtidos, contudo, apontam para o fato de que melhorias na técnica de análise lipídica de frações de *lipid rafts* por HPTLC devem ser realizadas, uma vez que foi possível a visualização de esteróis (Figura 28) e fosfolipídeos (Figura 29), porém, em bandas de baixa intensidade. Ainda, não foi possível visualizar glicolipídeos (Figura 30), de modo que alterações como a concentração de amostra aplicada na sílica deve ser aumentada e o número de células da linhagem RAEC deve ser superior ao utilizado. Em uma abordagem semelhante, a composição lipídica do extrato total de células da linhagem RAEC foi realizada em um estudo anterior, no qual, através da técnica de HPTLC, foi verificado que a LiRecDT1 reduziu a concentração de fosfatidiletanolamina, esfingomielina e fosfatidilcolina do extrato celular (CHAIM *et al.*, 2011a). Neste estudo, foi utilizado cerca de $5x10^6$ células para a realização do extrato celular, sendo que 20 µL de amostra foi aplicado na sílica para posterior análise por HPTLC (CHAIM *et al.*, 2011a). Em comparação com os experimentos realizados neste trabalho, onde o número de células utilizado foi cerca de $2\text{-}3x10^7$ células para a realização do extrato e isolamento de *lipid rafts*, o número de células utilizado pelos autores citados anteriormente foi inferior. Contudo, é reportado na literatura que, para realizar o isolamento de *lipid rafts*, uma densidade celular acima de $2x10^7$ é recomendada, corroborando o fato de que para a otimização dos experimentos de HPTLC, o aumento da densidade das células da linhagem RAEC pode ser necessário (SCHUCK *et al.*, 2003; LINGWOOD e SIMONS, 2007; GU *et al.*, 2012).

Até então, foi verificado que as fosfolipases-D de aranhas do gênero *Loxosceles* são capazes de se ligar a determinados substratos lipídicos, como esfingomielina, lisofosfatidilcolina (com maior afinidade), e fosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidiletanolamina e colesterol (com menor afinidade) (LEE e LYNCH, 2005; CHAIM *et al.*, 2011a; LAJOIE *et al.*, 2013; LAJOIE *et al.*, 2015). Contudo, estas enzimas podem hidrolisar outros lipídeos, por isso se faz necessária a análise da modulação de lipídeos presentes na membrana plasmática de diferentes tipos celulares, entre elas as células endoteliais.

A modulação do processo inflamatório, por exemplo, está associado à presença de esfingolipídeos como ceramida, ceramida-1-fosfato, e esfingosina-

1-fosfato (GOMEZ-MUNOZ *et al.*, 2016). Uma das funções das ceramidas e da ceramida-1-fosfato é estimular a atividade da fosfolipase A2 citosólica dependente de cálcio (cPLA2), levando à geração de ácido araquidônico e subsequente produção de prostaglandinas (HAYAKAWA *et al.*, 1996). A ceramida-1-fosfato é capaz de modular a resposta inflamatória dependendo da sua concentração e do tipo celular onde ela está presente, podendo exercer efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios. Além da via pró-inflamatória citada anteriormente, acredita-se que a ceramida-1-fosfato iniba o acúmulo de ceramidas em macrófagos, em células do epitélio pulmonar, e em células embrionárias renais humanas (GOMEZ-MUNOZ *et al.*, 2004; HANKINS *et al.*, 2011; BAUDISS *et al.*, 2015). É reportado na literatura que altos níveis de esfingosina-1-fosfato estão associados à resposta pró-inflamatória, modulando a permeabilidade vascular e promovendo o recrutamento de células do sistema imune (LAI *et al.*, 2010; ROVIEZZO *et al.*, 2011). Uma das vias associadas à estes eventos envolve uma cascata de sinalização que leva à fosforilação do complexo IkK e ativação de NF-kβ, que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (ALVAREZ *et al.*, 2010).

A possível geração de outros lipídeos pelas fosfolipases-D de *Loxosceles* pode ser importante também no contexto de modulação de canais iônicos. A literatura têm demonstrado que diversos tipos de canais, como canais de potássio, cálcio, transportadores de ADP/ATP, entre outros, são modulados por lipídeos bioativos por meio da ligação dos mesmos a estes canais (POVEDA *et al.*, 2014; HEDGER e SANSOM, 2016). Atualmente, o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) tem sido o modelo de estudo da modulação de canais iônicos por lipídeos. Os canais de potássio Kir, por exemplo, são ativados por PIP2, o que promove um aumento no fluxo de potássio para o interior da célula, restaurando o potencial de membrana após a despolarização da mesma (HANSEN, 2015). Ainda, canais de cálcio são modulados por PIP2, de modo que este lipídeo promove o fechamento dos mesmos, diminuindo o influxo de cálcio para o interior da célula, modulando eventos como a contração de células musculares e liberação de vesículas contendo neurotransmissores em neurônios (WU *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-MENCHACA *et al.*, 2012).

No caso das fosfolipases-D de *Loxosceles*, foi verificado que a toxina recombinante promove o influxo de cálcio em eritrócitos humanos, de modo que

este evento está associado à hemólise, possilvelmente decorrente de vias de sinalização ativadas por LPA (YANG *et al.*, 2000; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). Ainda, a toxina recombinante é capaz de promover o influxo de cálcio em células tumorais da linhagem B16F10, porém, sem afetar a viabilidade das mesmas (WILLE *et al.*, 2013). Apesar de promover o influxo de cálcio em diferentes tipos celulares, os mecanismos pelos quais as fosfolipases-D de *Loxosceles* exercem tal efeito ainda permanecem desconhecidos, porém, podem estar relacionados à geração de lipídeos bioativos, como o LPA, que estão associados à modulação de canais iônicos, como mencionado anteriormente.

Além de ressaltar a importância de se verificar outros substratos lipídicos para as fosfolipases-D, a hipótese de que a toxina recombinante pudesse estar sendo endocitada após interação com *lipid rafts* foi considerada, visto que LiRecDT1 é capaz de interagir com a membrana das células da linhagem RAEC, especificamente com regiões constituídas por estes microdomínios. Diversas toxinas, principalmente bacterianas, são exemplos de moléculas que, após interagirem com domínios de *lipid rafts*, são endocitadas e endereçadas a diferentes compartimentos intracelulares (SANDVIG *et al.*, 2004; SANDVIG *et al.*, 2014; SLATER *et al.*, 2014; FOEGEDING *et al.*, 2016).

Estudos desenvolvidos com a toxina VacA, por exemplo, têm mostrado que a toxina, após interagir com prováveis receptores proteicos ou lipídicos presentes em *lipid rafts*, é internalizada por endocitose via clatrina, e após 30 minutos, esta é encontrada em endossomos iniciais, e após cerca de 2 horas, em endossomos tardios (YAHIRO *et al.*, 2004; GAUTHIER *et al.*, 2005; GAUTHIER *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2010). Além disso, há evidências de que a toxina se associa a mitocôndrias. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos na internalização desta toxina ainda não foram estabelecidos (FOO *et al.*, 2010; FOEGEDING *et al.*, 2016). Outra toxina conhecida por interagir com domínios caracterizados por *lipid rafts* e ser internalizada é a toxina colérica. Esta, ao se ligar com o gangliosídeo GM1, abundante nestes microdomínios de membrana, induz o mecanismo de endocitose via cavéolas e clatrina (ORLANDI e FISHMAN, 1998; TORGERSEN *et al.*, 2001). A toxina, por sua vez, é endereçada aos compartimentos do complexo de Golgi e por fim ao Retículo Endoplasmático. Nesta organela, a toxina é reduzida, liberando a subunidade α, a qual é transportada para o citoplasma, onde por fim, a toxina se torna ativa e

exerce citotoxicidade (DE HAAN e HIRST, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2006; BASU e MUKHOPADHYAY, 2014). Ainda, a toxina Shiga, por exemplo, se liga ao glicoesfingolipídeo Gb3 presente na membrana plasmática, em regiões de *lipid rafts*, e é endocitada e encaminhada até o retículo endoplasmático via transporte retrógrado, de forma semelhante ao reportado para a toxina colérica (LAUVRAK *et al.*, 2006; UTSKARPEN *et al.*, 2010; SANDVIG *et al.*, 2014).

No caso da LiRecDT1, a primeira evidência de que a toxina estaria sendo endocitada foi obtida através da análise dos dados resultantes da microscopia de super-resolução. Após a obtenção das imagens, foi possível visualizar a interação da toxina recombinante com a estrutura formada por um agregado de proteínas caveolina-1 (Figura 31), corroborando os dados obtidos pela microscopia confocal. Além disso, a microscopia de super-resolução permitiu a visualização de uma estrutura com morfologia semelhante a um cálice, sugerindo a formação de uma cavéola. Ainda, aparentemente há um agregado de proteínas LiRecDT1/GFP co-localizando com esta estrutura, fornecendo indícios de que, além da interação com a membrana plasmática, especificamente com domínios formados por *lipid rafts*, a toxina poderia estar sendo endocitada via cavéolas, como ocorre com as toxinas mencionadas anteriormente.

É importante ressaltar que a endocitose via cavéolas pode ser induzida pela interação de proteínas com *lipid rafts*, mas também é um processo comum em células endoteliais, resultando no endereçamento de moléculas para estruturas como caveossomos ou a endossomos primários, compartimentos distintos, porém, que interagem entre si (PARTON e SIMONS, 2007; KISS e BOTOS, 2009). A endocitose via cavéolas é um processo relacionado à transcitose de moléculas como albumina e LDL, por exemplo (TIRUPPATHI *et al.*, 1997; SCHUBERT *et al.*, 2001; FRANK *et al.*, 2008), e a processos de reciclagem de caveolinas e receptores para a membrana, mantendo a sua densidade na mesma (PELKMANS e ZERIAL, 2005; BOUCROT *et al.*, 2011).

Para suportar a hipótese de endocitose da LiRecDT1, a presença desta toxina em vesículas acídicas do sistema endossomo/lisossomo foi avaliada por microscopia confocal. Após a análise dos resultados, foi possível observar a presença da LiRecDT1/GFP em vesículas marcadas com as proteínas LAMP-1 e LAMP2, ambas marcadoras de endossomos tardios e lisossomos (DUNSTER

et al., 2002; ESKELINEN, 2006). No entanto, a co-localização da toxina recombinante com as proteínas LAMP-1 e LAMP-2 se deu em uma dinâmica temporal diferente. Após 1 hora de exposição à toxina, foi observada a co-localização da mesma com vesículas marcadas por LAMP-1 (Figuras 36 e 37), porém, o mesmo evento não foi observado com a proteína LAMP-2. Apenas após 4 horas de exposição foi observada a co-localização da LiRecDT1/GFP com ambas as proteínas LAMP (Figuras 40 – 43).

A literatura reporta que tanto LAMP-1, quanto LAMP-2, são proteínas marcadoras de endossomos tardios e lisossomos (DUNSTER *et al.*, 2002; ESKELINEN, 2006). Contudo, há evidências de que a proteína LAMP-1, ao sair de vesículas da rede trans Golgi após sua síntese, são enviadas primeiramente para endossomos primários, para então serem endereçadas a endossomos tardios e subsequentemente lisossomos (COOK *et al.*, 2004). Isto pode reforçar a hipótese de que a observação da co-localização da LiRecDT1/GFP apenas com LAMP-1 após 1 hora de incubação, e não com LAMP-2, pode ser evidência de que a toxina recombinante está presente em vesículas de endossomos primários, no ínicio de seu processo de endocitose, sendo posteriormente endereçada à endossomos tardios e lisossomos.

Diversos tipos celulares, como monócitos, células dendriticas, plaquetas, e células endoteliais, são capazes de liberar vesículas exocíticas provenientes de corpos multivesiculares (SIMONS e RAPOSO, 2009; RAPOSO e STOORVOGEL, 2013). Estas estruturas são compostas por compartimentos provenientes de endossomos primários, que podem maturar para lisossomos ou podem gerar vesículas exocíticas que se fundem à membrana plasmática, sendo liberadas no meio extracelular (COCUCCI *et al.*, 2009). Uma vez que a LiRecDT1/GFP, após 1 hora, é encontrada em prováveis vesículas de endossomos primários, é possível que, em partes, ao invés de seguir para o lisossomo, a toxina pode estar sendo liberada novamente para o meio extracelular via vesículas exocíticas. É reportado na literatura que a ceramida formada a partir da atividade de esfingomielinases promove a formação de corpos multivesiculares que destinam vesículas para a membrana plasmática, e não para lisossomos, porém, o mecanismo molecular que promove este evento ainda não está claro (TRAJKOVIC *et al.*, 2008). No caso da LiRecDT1, sugere-se que há a possibilidade de a ceramida-1-fosfato gerada a partir da hidrólise da

esfingomielina pode exercer um efeito semelhante e estimular a exocitose da toxina.

Além disso, células endoteliais são capazes de de liberar microvesículas em respostas à ativação celular ou apoptose (LEROYER *et al.,* 2010). Estas vesículas se originam através do desprendimento direto da membrana plasmática em um processo denominado *shedding* (COCUCCI *et al*., 2009). De maneira geral, as microvesículas carregam componentes citosólicos como proteínas, lipídios, fatores de transcrição, RNAs e microRNAs, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, entre outras, representando um importante modo de comunicação intercelular, servindo como veículo para a transferência destas moléculas sinalizadoras para as células vizinhas (HUANG *et al*, 2015; RAPOSO E STOORVOGEL, 2013). No caso das fosfolipaes-D de *Loxosceles*, foi verificado que a LiRecDT1 promove o *shedding* de membrana de eritrócitos expostos à mesma (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009). Ainda, uma vez que a LiRecDT1 é capaz de induzir inflamação, é possível que esta estimule a liberação de microvesículas, que, por se originarem da membrana plasmática, podem conter a toxina recombinante, anteriormente ligada à microdomínios de *lipid rafts*. Desta forma, postula-se que a LiRecDT1 pode estar sendo endereçada para compartimentos do sistema endossomo/lisossomo, ou pode estar sendo enviada novamente ao meio extracelular, por meio de vesículas exocíticas ou microvesículas.

Em relação às toxinas do veneno loxoscélico, a interação de determinadas toxinas com a membrana plasmática e sua associação com eventos de internalização das mesmas é descrita na literatura. Em um estudo envolvendo a exposição de células da linhagem RAEC ao veneno de *L. intermedia*, foi verificado que as toxinas do veneno, além de interagirem com a membrana plasmática, são internalizadas e encaminhadas para compartimentos do sistema endossomo/lisossomo, porém, sem causar danos às vesículas (NOWATZKI *et al.*, 2010). Estes dados corroboram os resultados obtidos neste trabalho, onde foi possível verificar que a LiRecDT1 é uma das toxinas do veneno que são internalizadas e endereçadas para estes compartimentos. Além disso, é importante ressaltar que a literatura não apresenta dados relativos à endocitose de toxinas de venenos de aranhas.

Existem outros exemplos de toxinas que são internalizadas e endereçadas inicialmente para compartimentos do sistema endossomo/lisossomo, como ocorre no caso da toxina VacA, mencionada anteriormente. Em relação a toxinas de venenos animais, é reportado que toxinas de serpentes do gênero *Naja*, conhecidas como citotoxinas (CTs), interagem com a membrana de diferentes tipos celulares, e são endocitadas e encaminhadas para lisossomos após cerca de 1 hora de incubação. Estas toxinas atuam como proteínas formadoras de poros, promovendo a permeabilização da membrana lisossomal, por sua vez liberando o conteúdo vesicular em conjunto com as citotoxinas, levando ao processo de morte celular por apoptose cerca de 3 horas após a incubação com a toxina (FEOFANOV *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2013; GASANOV *et al.*, 2015). Contudo, de maneira diferente do observado para a toxina antraz, as citotoxinas parecem ser sensíveis ao pH lisossomal, sendo que é postulado que o baixo pH reduz a citotoxicidade destas enzimas (CHIANG *et al.*, 1996; FEOFANOV *et al.*, 2005).

Os mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade destas toxinas não terem sido elucidados até então, porém, é reportado na literatura que catepsinas, enzimas presentes no lúmen das vesículas lisossomais, estão associadas à morte celular por apoptose, uma vez que estas clivam moléculas anti-apoptóticas da família Bcl-2 e promovem a movimentação de citocromo C das mitocôndrias para o citoplasma (CIRMAN *et al.*, 2004; DROGA-MAZOVEC *et al.*, 2008; TURK e TURK, 2009).

Outro exemplo de toxina internalizada e endereçada para compartimentos do sistema endossomo/lisossomo é a toxina antrax, do *Bacillus anthracis*, onde foi demonstrado que esta toxina possui três domínios, sendo que dois destes domínios são os peptídeos ativos que exercem toxicidade, com atividade de adenilato ciclase, levando à elevação de AMP cíclico intracelular, e atividade metaloproteásica que cliva MAPK quinases. O outro domínio (conhecido como antígeno protetivo, ou PA) é necessário para para a interação com a membrana plasmática e mediar o transporte para vesículas endossomais e lisossomais. Uma vez dentro destes compartimentos, o domínio PA forma poros nas membranas das vesículas devido ao baixo pH, assim permitindo a saída das toxinas ativas para que estas possam interagir com seus alvos no citoplasma e exercer toxicidade, antes de serem degradadas pelas enzimas lisossomais

(ABRAMI *et al.*, 2003; GRUENBERG e VAN DER GOOT, 2006; KRANTZ *et al.*, 2006). Além disso, é reportado que a toxina antrax, por meio de seus dois domínios ativos, pode estar associada à resposta inflamatória de duas formas: através da formação de edema no tecido infectado, pelo aumento de AMP cíclico intracelular; e pela liberação de moléculas pró-inflamatórias resultante da morte celular oriunda da clivagem de MAPK quinases, associadas a diversos processos celulares. Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais a toxina antrax está associada a estes eventos ainda permanecem desconhecidos (FIROVED *et al.*, 2005; MOAYERI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014).

Ainda não se sabe se a LiRecDT1 afeta a permeabilidade da membrana lisossomal, porém, baseado nos dados apresentados anteriormente, é possível especular que sua toxicidade pode estar associada não somente à hidrólise de esfingomielina na membrana plasmática, mas também à possível permeabilização da membrana lisossomal, como visto com a toxina VacA, citotoxinas de serpentes do gênero *Naja*, e até mesmo com a toxina antrax, apesar de não haver dados na literatura reportanto atividade de fosfolipases-D sobre a membrana de vesículas lisossomais. No entanto, é reportada a presença de fosfolipases-A2 lisossomais com atividade sobre fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, prevenindo o acúmulo de glicerofosfolipídeos nas membranas celulares, porém, estes eventos não estão associados à citotoxicidade (HIRAOKA *et al.*, 2005; ABE e SHAYMAN, 2009; GLUKHOVA *et al.*, 2015).

A presença de toxinas endocitadas no citoplasma também pode estar associado à modulação de vias de sinalização associadas à proteína G. A toxina pertussis, da bactéria *Bordetella pertussis*, é outro exemplo de toxina que é internalizada e endereçada para compartimentos intracelulares. Esta toxina é composta por diferentes subunidades, sendo uma delas, a subunidade A (também conhecida como S1), a qual é ativa e exerce citotoxicidade (KASLOW e BURNS, 1992; PLAUT e CARBONETTI, 2008). Após interação com glicoproteínas na membrana plasmática, a toxina é transportada de maneira retrógrada para o complexo de Golgi e por fim, para o retículo endoplasmático, onde ocorre a dissociação da subunidade ativa das outras subunidades que compõem a toxina. A subunidade S1, por sua vez, sofre alterações conformacionais que permitem com que a mesma seja transportada do retículo

endoplasmático para o citoplasma (SPOONER *et al.*, 2006; BANERJEE *et al.*, 2016). A subunidade S1 tem como atividade a ribosilação da subunidade α de proteínas G heterotrímericas, inativando vias de sinalização associadas a estas proteínas. Dentre os eventos de sinalização afetados, pode-se citar o aumento da concentração de AMP cíclico intracelular devido à ação de adenilil ciclases citoplasmáticas, geralmente inibidas por proteínas G, que no caso, estariam inativadas pela toxina pertussis. O aumento de AMP cíclico intracelular leva ao bloqueio de enzimas reguladas por outras proteínas G, levando à desregulaçao do sistema imune, como por exemplo, redução da síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e redução no recrutamento de neutrófilos no tecido afetado (GRAF *et al.*, 1992; STEIN *et al.*, 1994; MELVIN *et al.*, 2014).

Ainda, diversas células apresentam fosfolipases-D no citoplasma, e sua atividade está associada, por exemplo, à reorganização do citoesqueleto (RUDGE e WAKELAM, 2009). É reportado na literatura que o ácido fosfatídico gerado a partir da hidrólise de fosfatidilcolina mediada por estas enzimas promove a formação de PIP2, e este, por sua vez, facilita a associação da proteína talina à integrinas, formando um complexo proteico ativo e permitindo a adesão celular (POWNER *et al.*, 2005; DU e FROHMAN, 2009). Ainda, o ácido fosfatídico se liga à enzima miosina fosfatase, inibindo sua atividade catalítica, permitindo com que a miosina seja fosforilada e levando ao aumento da contratibilidade de fibras de estresse formadas pelo citoesqueleto de actina-miosina na região cortical celular. Este evento leva, por sua vez, à morfologia esférica das células. Quando a fosfolipase-D intracelular se apresenta inativa, esta não produz ácido fosfatídico, e o evento supracitado não ocorre, de modo que o complexo actina-miosina é desfeito, permitindo o espalhamento celular durante a adesão (DU e FROHMAN, 2009).

Sabe-se também que fosfolipases-D intracelulares são translocadas para a região da membrana plasmática em células aderentes e estão associadas ao “espraiamento” das mesmas, sendo que a inativação destas enzimas diminui este evento. Ainda, o ácido fosfatídico promove a translocação da proteína Rac1-GTPase para a membrana plasmática e induz a dissociação do inibidor Rho-GTP ligado à Rac1. A Rac1, por sua vez, ativa um complexo enzimático que leva à polimerização de filamentos de actina, facilitando a formação de estruturas como lamelipódios e filopódios, permitindo a adesão celular (EDEN *et al.*, 2002;

CHAE *et al.*, 2008). Sendo assim, é possível que a LiRecDT1 pode estar associada a eventos semelhantes de remodelação de citoesqueleto, uma vez que a toxina recombinante foi endocitada, e pode estar sendo translocada para o citoplasma. Ainda, a microscopia de super-resolução evidenciou a presença da LiRecDT1/GFP na periferia celular, em regiões de adesão, o que poderia sugerir a presença da toxina nesta região, possivelmente associada a eventos de remodelação do citoesqueleto, como mencionado anteriormente.

Desta forma, com os resultados obtidos até então, é possível sugererir que a fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* interage com a membrana plasmática de células endoteliais, principalmente em regiões contendo microdomínios de membrana caracterizados pela presença de caveolina-1, e este evento pode estar associado a diversos processos de sinalização devido à geração de mediadores lipídicos como ceramida-1-fosfato e ácido lisofosfatídico. Além disso, especula-se a possibilidade de estas enzimas estarem associadas à produção de outros mediadores lipídicos, visto que sua interação com outros substratos lipídicos ainda é pouco explorada. A sinalização mediada por metabólitos desta natureza está associada, por exemplo, à modulação de estruturas como a própria membrana plasmática, citoesqueleto, e processos celulares de endocitose ou exocitose. Ainda, a fosfolipase-D recombinante é endocitada e endereçada para compartimentos do sistema endossomo/lisossomo, contudo, ainda não está claro se o destino final desta toxina é de fato a degradação em vesículas lisossomais. Especula-se a possibilidade de que a toxina possa estar sendo recliclada para a membrana plasmática e então exocitada antes de atingir lisossomos tardios, e ainda pode estar sendo enviada para fora da célula por microvesículas resultantes do processo de *shedding* de membrana.

É importante ressaltar que o fracionamento de microdomínios de *lipid rafts* e a investigação dos lipídeos modulados pela LiRecDT1 nestas regiões ainda estão sob padronização experimental. Ainda, outras metodologias, como o isolamento de lisossomos por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, devem ser realizadas para avaliar com maior detalhamento o evento de internalização e endereçamento da LiRecDT1 para compartimentos endossomais e lisossomais. Uma vez que não se sabe se o destino final da toxina é a degradação em lisossomos, faz-se necessária a investigação mais

aprofundada da via endocítica pela qual a toxina está sendo internalizada, a fim de determinar se a mesma está sendo enviada a outros compartimentos celulares, como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, ou se está sendo exocitada. Desta maneira, ressalta-se a importância da realização de mais estudos em relação aos mecanismos moleculares pelos quais as fosfolipases-D de *Loxosceles* interagem não somente com células endoteliais, mas também com outros tipos celulares, a fim de elucidar parceiros moleculares para as fosfolipases-D, vias de sinalização associadas à ação das mesmas, e compreender, no contexto do loxoscelismo, o papel destas enzimas como toxinas do veneno. Além disso, o uso destas fosfolipases-D como ferramentas biotecnológicas pode ser explorado no contexto do processo inflamatório, por exemplo, por meio do desenvolvimento de novos fármacos e produção de testes diagnósticos.

8.0 CONCLUSÃO

Durante o período de desenvolvimento deste trabalho, foi possível:

- determinar a citotoxicidade da fosfolipase-D de *L. intermedia* sobre células da linhagem RAEC, uma vez que as alterações morfológicas de células RAEC após exposição ao veneno de LiRecDT1 foram claras já após 1 hora de incubação com ambos, sendo que a toxina recombinante induziu principalmente a vacuolização citoplasmática destas células de maneira tempo-dependente, até 24 horas;
- determinar que o uso do reagente BODIPY para a marcação da toxina LiRecDT1 para posterior visualização da mesma por microscopia de fluorescência confocal, TIRF e super-resolução, não foi eficiente, sendo que a marcação com o fluoróforo reduziu a atividade da toxina e sua intensidade de fluorescência foi muito baixa, impedindo a utilização da mesma nos experimentos;
- determinar a interação da LiRecDT1/GFP com a membrana plasmática de células RAEC, especificamente com microdomínios de membrana caracterizados por *lipid rafts*, sendo que este evento ocorre de maneira tempo-dependente, de modo que a toxina se liga às células após 30 minutos, e então promove a reorganização destes domínios de membrana após 1 hora, sendo este efeito mais pronunciado após 4 horas;
- determinar que a internalização da LiRecDT1/GFP está associada à cavéolas, evento que ocorre também de maneira tempo-dependente, de modo que após 1 hora de exposição a toxina recombinante apresenta co-localização com a proteína caveolina-1, e após 4 horas, foi possível observar o princípio de internalização da toxina recombinante, uma vez que esta foi visualizada interagindo com cavéolas na membrana plasmática;
- determinar que a LiRecDT1/GFP é endereçada para vesículas do sistema endossomo/ lisossomo, porém, ainda não foi evidenciado o destino final da toxina recombinante, sendo que especula-se a possibilidade de a mesma estar associada à uma rota retrógrada para a membrana, derivada de vesículas de endossomos primários ou corpos multivesiculares.

9.0 REFERÊNCIAS

ABE, A. e SHAYMAN, J. A. The role of negatively charged lipids in lysosomal phospholipase A2 function. **J Lipid Res.** v. 50, p. 2027-2035, 2009.

ABRAMI, L., LIU, S., COSSON, P., LEPPLA, S. H. e VAN DER GOOT, F. G. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. **J Cell Biol.** v. 160, p. 321-328, 2003.

ALVAREZ, S. E., HARIKUMAR, K. B., HAIT, N. C., ALLEGOOD, J., STRUB, G. M., KIM, E. Y., MACEYKA, M., JIANG, H., LUO, C., KORDULA, T., MILSTIEN, S. e SPIEGEL, S. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. **Nature.** v. 465, p. 1084-1088, 2010.

AOKI, J., TAIRA, A., TAKANEZAWA, Y., KISHI, Y., HAMA, K., KISHIMOTO, T., MIZUNO, K., SAKU, K., TAGUCHI, R. e ARAI, H. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. **J Biol Chem.** v. 277, p. 48737-48744, 2002.

APPEL, M. H., DA SILVEIRA, R. B., CHAIM, O. M., PALUDO, K. S., SILVA, D. T., CHAVES, D. M., DA SILVA, P. H., MANGILI, O. C., SENFF-RIBEIRO, A., GREMSKI, W., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (Loxosceles intermedia) venom. **Biochim Biophys Acta.** v. 1780, p. 167-178, 2008.

APPEL, M. H., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, W. e VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertabrate Survival Journal.** v. 2, p. 152 - 158, 2005.

BANERJEE, T., CILENTI, L., TAYLOR, M., SHOWMAN, A., TATULIAN, S. A. e TETER, K. Thermal Unfolding of the Pertussis Toxin S1 Subunit Facilitates Toxin Translocation to the Cytosol by the Mechanism of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. **Infect Immun.** v. 84, p. 3388-3398, 2016.

BARBARO, K. C., EICKSTEDT, V. R. e MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important Loxosceles (Araneae) species in Brazil. **Toxicon.** v. 32, p. 113-120, 1994.

BARBARO, K. C., LIRA, M. S., ARAUJO, C. A., PAREJA-SANTOS, A., TAVORA, B. C., PREZOTTO-NETO, J. P., KIMURA, L. F., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. e SANTORO, M. L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of Loxosceles gaucho spider venom. **Toxicon.** v. 56, p. 972-979, 2010.

BASU, I. e MUKHOPADHYAY, C. Insights into binding of cholera toxin to GM1 containing membrane. **Langmuir.** v. 30, p. 15244-15252, 2014.

BAUDISS, K., AYATA, C. K., LAZAR, Z., CICKO, S., BECKERT, J., MEYER, A., ZECH, A., VIEIRA, R. P., BITTMAN, R., GOMEZ-MUNOZ, A., MERFORT, I. e IDZKO, M. Ceramide-1-phosphate inhibits cigarette smoke-induced airway inflammation. **Eur Respir J.** v. 45, p. 1669-1680, 2015.

BAUWENS, A., BETZ, J., MEISEN, I., KEMPER, B., KARCH, H. e MUTHING, J. Facing glycosphingolipid-Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. **Cell Mol Life Sci.** v. 70, p. 425-457, 2013.

BENISTANT, C., DEHOUCK, M. P., FRUCHART, J. C., CECCHELLI, R. e LAGARDE, M. Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: effect of the coculture with astrocytes. **J Lipid Res.** v. 36, p. 2311-2319, 1995.

BERRIDGE, M. V. e TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem Biophys.** v. 303, p. 474-482, 1993.

BINFORD, G. J., BODNER, M. R., CORDES, M. H., BALDWIN, K. L., RYNERSON, M. R., BURNS, S. N. e ZOBEL-THROPP, P. A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. **Mol Biol Evol.** v. 26, p. 547-566, 2009.

BINFORD, G. J., CALLAHAN, M. S., BODNER, M. R., RYNERSON, M. R., NUNEZ, P. B., ELLISON, C. E. e DUNCAN, R. P. Phylogenetic relationships of Loxosceles and Sicarius spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. **Mol Phylogenet Evol.** v. 49, p. 538-553, 2008.

BINFORD, G. J. e WELLS, M. A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v. 135, p. 25-33, 2003.

BOUCROT, E., HOWES, M. T., KIRCHHAUSEN, T. e PARTON, R. G. Redistribution of caveolae during mitosis. **J Cell Sci.** v. 124, p. 1965-1972, 2011.

BROWMAN, D. T., RESEK, M. E., ZAJCHOWSKI, L. D. e ROBBINS, S. M. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. **J Cell Sci.** v. 119, p. 3149-3160, 2006.

BRYANT, C. e FITZGERALD, K. A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. **Trends Cell Biol.** v. 19, p. 455-464, 2009.

BUONASSISI, V. Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. **Exp Cell Res.** v. 76, p. 363-368, 1973.

CANSELL, M., GOUYGOU, J. P., JOZEFONVICZ, J. e LETOURNEUR, D. Lipid composition of cultured endothelial cells in relation to their growth. **Lipids.** v. 32, p. 39-44, 1997.

CATALAN, A., CORTES, W., SAGUA, H., GONZALEZ, J. e ARAYA, J. E. Two new phospholipase D isoforms of Loxosceles laeta: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. **J Biochem Mol Toxicol.** v. 25, p. 393-403, 2011.

CAZZOLLI, R., SHEMON, A. N., FANG, M. Q. e HUGHES, W. E. Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. **IUBMB Life.** v. 58, p. 457-461, 2006.

CHAE, Y. C., KIM, J. H., KIM, K. L., KIM, H. W., LEE, H. Y., HEO, W. D., MEYER, T., SUH, P. G. e RYU, S. H. Phospholipase D activity regulates integrin-mediated cell spreading and migration by inducing GTP-Rac translocation to the plasma membrane. **Mol Biol Cell.** v. 19, p. 3111-3123, 2008.

CHAIM, O. M.; SILVA, D. T. ; FERRER, V. P. ; CHAVES-MOREIRA, D. ; SILVEIRA, R. B. ; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. ; NADER, H. B. Mechanistic relationship of phospholipasic activity and toxicity of brown spider venom. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, São Paulo. Programa e Resumos da XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008.

CHAIM, O. M., DA SILVEIRA, R. B., TREVISAN-SILVA, D., FERRER, V. P., SADE, Y. B., BOIA-FERREIRA, M., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., TAKAHASHI, H. K., TOLEDO, M. S., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim Biophys Acta.** v. 1811, p. 84-96, 2011a.

CHAIM, O. M., SADE, Y. B., DA SILVEIRA, R. B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., VON DIETRICH, C. P., NADER, H. B. e SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAIM, O. M., TREVISAN-SILVA, D., CHAVES-MOREIRA, D., WILLE, A. C., FERRER, V. P., MATSUBARA, F. H., MANGILI, O. C., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A. e VEIGA, S. S. Brown Spider (Loxosceles genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins (Basel).** v. 3, p. 309-344, 2011b.

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

CHATZAKI, M., HORTA, C. C., ALMEIDA, M. O., PEREIRA, N. B., MENDES, T. M., DIAS-LOPES, C., GUIMARAES, G., MORO, L., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., HORTA, M. C. e KALAPOTHAKIS, E. Cutaneous loxoscelism caused by Loxosceles similis venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon.** v. 60, p. 21-30, 2012.

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. e 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.

CHAVES-MOREIRA, D., SOUZA, F. N., FOGACA, R. T., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M. e VEIGA, S. S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **J Cell Biochem.** v. 112, p. 2529-2540, 2011.

CHIANG, C. M., CHIEN, K. Y., LIN, H. J., LIN, J. F., YEH, H. C., HO, P. L. e WU, W. G. Conformational change and inactivation of membrane phospholipid-related activity of cardiotoxin V from Taiwan cobra venom at acidic pH. **Biochemistry.** v. 35, p. 9167-9176, 1996.

CHIANTIA, S. e LONDON, E. Sphingolipids and membrane domains: recent advances. **Handb Exp Pharmacol.** v. p. 33-55, 2013.

CHINNAPEN, D. J., CHINNAPEN, H., SASLOWSKY, D. e LENCER, W. I. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. **FEMS Microbiol Lett.** v. 266, p. 129-137, 2007.

CIRMAN, T., ORESIC, K., MAZOVEC, G. D., TURK, V., REED, J. C., MYERS, R. M., SALVESEN, G. S. e TURK, B. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. **J Biol Chem.** v. 279, p. 3578-3587, 2004.

COCUCCI, E., RACCHETTI, G. e MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol.** v. 19, p. 43-51, 2009.

COOK, N. R., ROW, P. E. e DAVIDSON, H. W. Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. **Traffic.** v. 5, p. 685-699, 2004.

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

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

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

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom gland. **Biochimie.** v. 88, p. 1241-1253, 2006.

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., SILVA, D. T., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. e GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (Loxosceles intermedia) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie.** v. 89, p. 289-300, 2007b.

DA SILVEIRA, R. B., WILLE, A. C., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., SILVA, D. T., FRANCO, C. R., TOMA, L., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Biochem J.** v. 406, p. 355-363, 2007c.

DANTAS, A. E., CARMO, A. O., HORTA, C. C., LEAL, H. G., OLIVEIRA-MENDES, B. B., MARTINS, A. P., CHAVEZ-OLORTEGUI, C. e KALAPOTHAKIS, E. Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from Loxosceles similis venom gland. **Toxicon.** v. 120, p. 97-106, 2016.

DAVALOS, A., FERNANDEZ-HERNANDO, C., SOWA, G., DERAKHSHAN, B., LIN, M. I., LEE, J. Y., ZHAO, H., LUO, R., COLANGELO, C. e SESSA, W. C. Quantitative proteomics of caveolin-1-regulated proteins: characterization of polymerase i and transcript release factor/CAVIN-1 IN endothelial cells. **Mol Cell Proteomics.** v. 9, p. 2109-2124, 2010.

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 CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., ARAUJO, S. C., GABRIEL DE, M. Y., MANGILI, O. C., CRUZ, I., CHAVEZ-OLORTEGUI, C. e KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider Loxosceles intermedia. **Toxicon.** v. 44, p. 273-280, 2004.

DE GIUSEPPE, P. O., ULLAH, A., SILVA, D. T., GREMSKI, L. H., WILLE, A. C., CHAVES MOREIRA, D., RIBEIRO, A. S., CHAIM, O. M., MURAKAMI, M. T., VEIGA, S. S. e ARNI, R. K. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 409, p. 622-627, 2011.

DE HAAN, L. e HIRST, T. R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). **Mol Membr Biol.** v. 21, p. 77-92, 2004.

DE OLIVEIRA, K. C., GONCALVES DE ANDRADE, R. M., PIAZZA, R. M., FERREIRA, J. M., JR., VAN DEN BERG, C. W. e TAMBOURGI, D. V. Variations in Loxosceles spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon.** v. 45, p. 421-429, 2005.

DE SANTI FERRARA, G. I., FERNANDES-PEDROSA MDE, F., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M., PORTARO, F. C., MANZONI-DE-ALMEIDA, D., MURAKAMI, M. T., ARNI, R. K., VAN DEN BERG, C. W., HO, P. L. e TAMBOURGI, D. V. SMase II, a new sphingomyelinase D from Loxosceles laeta venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon.** v. 53, p. 743-753, 2009.

DELAUNAY, J. L., BRETON, M., TRUGNAN, G. e MAURICE, M. Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. **Biochim Biophys Acta.** v. 1778, p. 105-112, 2008.

DIERS, A. R., BRONIOWSKA, K. A. e HOGG, N. Nitrosative stress and redox-cycling agents synergize to cause mitochondrial dysfunction and cell death in endothelial cells. **Redox Biol.** v. 1, p. 1-7, 2013.

DOS SANTOS, L. D., DIAS, N. B., ROBERTO, J., PINTO, A. S. e PALMA, M. S. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. **Protein Pept Lett.** v. 16, p. 933-943, 2009.

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

DRAGULEV, B., BAO, Y., RAMOS-CERRILLO, B., VAZQUEZ, H., OLVERA, A., STOCK, R., ALGARON, A. e FOX, J. W. 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. **J Invest Dermatol.** v. 127, p. 1264-1266, 2007.

DRESCHERS, S., FRANZ, P., DUMITRU, C., WILKER, B., JAHNKE, K. e GULBINS, E. Infections with human rhinovirus induce the formation of distinct functional membrane domains. **Cell Physiol Biochem.** v. 20, p. 241-254, 2007.

DROGA-MAZOVEC, G., BOJIC, L., PETELIN, A., IVANOVA, S., ROMIH, R., REPNIK, U., SALVESEN, G. S., STOKA, V., TURK, V. e TURK, B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. **J Biol Chem.** v. 283, p. 19140-19150, 2008.

DU, G. e FROHMAN, M. A. A lipid-signaled myosin phosphatase surge disperses cortical contractile force early in cell spreading. **Mol Biol Cell.** v. 20, p. 200-208, 2009.

DUNSTER, K., TOH, B. H. e SENTRY, J. W. Early endosomes, late endosomes, and lysosomes display distinct partitioning strategies of inheritance with similarities to Golgi-derived membranes. **Eur J Cell Biol.** v. 81, p. 117-124, 2002.

DURGAM, G. G., TSUKAHARA, R., MAKAROVA, N., WALKER, M. D., FUJIWARA, Y., PIGG, K. R., BAKER, D. L., SARDAR, V. M., PARRILL, A. L., TIGYI, G. e MILLER, D. D. Synthesis and pharmacological evaluation of second-generation phosphatidic acid derivatives as lysophosphatidic acid receptor ligands. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 16, p. 633-640, 2006.

EDEN, S., ROHATGI, R., PODTELEJNIKOV, A. V., MANN, M. e KIRSCHNER, M. W. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. **Nature.** v. 418, p. 790-793, 2002.

ESKELINEN, E. L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Mol Aspects Med.** v. 27, p. 495-502, 2006.

ESNAULT, C., LEIBER, D., TOFFANO-NIOCHE, C., TANFIN, Z. e VIROLLE, M. J. Another example of enzymatic promiscuity: the polyphosphate kinase of Streptomyces lividans is endowed with phospholipase D activity. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 101, p. 139-145, 2017.

FALGUIERES, T., MALLARD, F., BARON, C., HANAU, D., LINGWOOD, C., GOUD, B., SALAMERO, J. e JOHANNES, L. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. **Mol Biol Cell.** v. 12, p. 2453-2468, 2001.

FALGUIERES, T., ROMER, W., AMESSOU, M., AFONSO, C., WOLF, C., TABET, J. C., LAMAZE, C. e JOHANNES, L. Functionally different pools of Shiga toxin receptor, globotriaosyl ceramide, in HeLa cells. **FEBS J.** v. 273, p. 5205-5218, 2006.

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

FEOFANOV, A. V., SHARONOV, G. V., ASTAPOVA, M. V., RODIONOV, D. I., UTKIN, Y. N. e ARSENIEV, A. S. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. **Biochem J.** v. 390, p. 11-18, 2005.

FERNANDES-PEDROSA, F., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M., KOBASHI, L. S., ALMEIDA, D. D., HO, P. L. e TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of Loxosceles laeta (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics.** v. 9, p. 279, 2008.

FERRER, V. P., DE MARI, T. L., GREMSKI, L. H., TREVISAN SILVA, D., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, W., CHAIM, O. M., SENFF-RIBEIRO, A., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (Loxosceles intermedia) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 7, p. e2206, 2013.

FIROVED, A. M., MILLER, G. F., MOAYERI, M., KAKKAR, R., SHEN, Y., WIGGINS, J. F., MCNALLY, E. M., TANG, W. J. e LEPPLA, S. H. Bacillus anthracis edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. **Am J Pathol.** v. 167, p. 1309-1320, 2005.

FISCHER, M. L. e VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by Loxosceles intermedia and Loxosceles laeta (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Parana, Brazil. **J Med Entomol.** v. 42, p. 756-765, 2005.

FISH, K. N. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. **Curr Protoc Cytom.** v. Chapter 12, p. Unit12 18, 2009.

FOEGEDING, N. J., CASTON, R. R., MCCLAIN, M. S., OHI, M. D. e COVER, T. L. An Overview of Helicobacter pylori VacA Toxin Biology. **Toxins (Basel).** v. 8, p. 2016.

FOO, J. H., CULVENOR, J. G., FERRERO, R. L., KWOK, T., LITHGOW, T. e GABRIEL, K. Both the p33 and p55 subunits of the Helicobacter pylori VacA toxin are targeted to mammalian mitochondria. **J Mol Biol.** v. 401, p. 792-798, 2010.

FOURCADE, O., SIMON, M. F., VIODE, C., RUGANI, N., LEBALLE, F., RAGAB, A., FOURNIE, B., SARDA, L. e CHAP, H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. **Cell.** v. 80, p. 919-927, 1995.

FRANK, P. G., PAVLIDES, S., CHEUNG, M. W., DAUMER, K. e LISANTI, M. P. Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 295, p. C242-248, 2008.

FUKUSHIMA, N., WEINER, J. A., KAUSHAL, D., CONTOS, J. J., REHEN, S. K., KINGSBURY, M. A., KIM, K. Y. e CHUN, J. Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. **Mol Cell Neurosci.** v. 20, p. 271-282, 2002.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci.** v. 304, p. 261-267, 1992.

GASANOV, S. E., SHRIVASTAVA, I. H., ISRAILOV, F. S., KIM, A. A., RYLOVA, K. A., ZHANG, B. e DAGDA, R. K. Naja naja oxiana Cobra Venom Cytotoxins CTI and CTII Disrupt Mitochondrial Membrane Integrity: Implications for Basic Three-Fingered Cytotoxins. **PLoS One.** v. 10, p. e0129248, 2015.

GAUTHIER, N. C., MONZO, P., GONZALEZ, T., DOYE, A., OLDANI, A., GOUNON, P., RICCI, V., CORMONT, M. e BOQUET, P. Early endosomes associated with dynamic F-actin structures are required for late trafficking of H. pylori VacA toxin. **J Cell Biol.** v. 177, p. 343-354, 2007.

GAUTHIER, N. C., MONZO, P., KADDAI, V., DOYE, A., RICCI, V. e BOQUET, P. Helicobacter pylori VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. **Mol Biol Cell.** v. 16, p. 4852-4866, 2005.

GLUKHOVA, A., HINKOVSKA-GALCHEVA, V., KELLY, R., ABE, A., SHAYMAN, J. A. e TESMER, J. J. Structure and function of lysosomal phospholipase A2 and lecithin:cholesterol acyltransferase. **Nat Commun.** v. 6, p. 6250, 2015.

GOGGEL, R., WINOTO-MORBACH, S., VIELHABER, G., IMAI, Y., LINDNER, K., BRADE, L., BRADE, H., EHLERS, S., SLUTSKY, A. S., SCHUTZE, S., GULBINS, E. e UHLIG, S. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. **Nat Med.** v. 10, p. 155-160, 2004.

GOMEZ-MUNOZ, A., GANGOITI, P., ARANA, L., OURO, A., RIVERA, I. G., ORDONEZ, M. e TRUEBA, M. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. **Biochim Biophys Acta.** v. 1831, p. 1060-1066, 2013.

GOMEZ-MUNOZ, A., KONG, J. Y., SALH, B. e STEINBRECHER, U. P. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. **J Lipid Res.** v. 45, p. 99-105, 2004.

GOMEZ-MUNOZ, A., PRESA, N., GOMEZ-LARRAURI, A., RIVERA, I. G., TRUEBA, M. e ORDONEZ, M. Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. **Prog Lipid Res.** v. 61, p. 51-62, 2016.

GRAF, R., CODINA, J. e BIRNBAUMER, L. Peptide inhibitors of ADP-ribosylation by pertussis toxin are substrates with affinities comparable to those of the trimeric GTP-binding proteins. **Mol Pharmacol.** v. 42, p. 760-764, 1992.

GRASSME, H., JEKLE, A., RIEHLE, A., SCHWARZ, H., BERGER, J., SANDHOFF, K., KOLESNICK, R. e GULBINS, E. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. **J Biol Chem.** v. 276, p. 20589-20596, 2001.

GRASSME, H., JENDROSSEK, V., RIEHLE, A., VON KURTHY, G., BERGER, J., SCHWARZ, H., WELLER, M., KOLESNICK, R. e GULBINS, E. Host defense against Pseudomonas aeruginosa requires ceramide-rich membrane rafts. **Nat Med.** v. 9, p. 322-330, 2003.

GREMSKI, L. H., DA SILVEIRA, R. B., CHAIM, O. M., PROBST, C. M., FERRER, V. P., NOWATZKI, J., WEINSCHUTZ, H. C., MADEIRA, H. M., GREMSKI, W., NADER, H. B., SENFF-RIBEIRO, A. e VEIGA, S. S. A novel expression profile of the Loxosceles intermedia spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst.** v. 6, p. 2403-2416, 2010.

GREMSKI, L. H., TREVISAN-SILVA, D., FERRER, V. P., MATSUBARA, F. H., MEISSNER, G. O., WILLE, A. C., VUITIKA, L., DIAS-LOPES, C., ULLAH, A., DE MORAES, F. R., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., BARBARO, K. C., MURAKAMI, M. T., ARNI, R. K., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M. e VEIGA, S. S. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon.** v. 83, p. 91-120, 2014.

GRUENBERG, J. e VAN DER GOOT, F. G. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 7, p. 495-504, 2006.

GU, M. X., FU, Y., SUN, X. L., DING, Y. Z., LI, C. H., PANG, W., PAN, S. e ZHU, Y. Proteomic analysis of endothelial lipid rafts reveals a novel role of statins in antioxidation. **J Proteome Res.** v. 11, p. 2365-2373, 2012.

GUO, Y., SINGLETON, P. A., ROWSHAN, A., GUCEK, M., COLE, R. N., GRAHAM, D. R., VAN EYK, J. E. e GARCIA, J. G. Quantitative proteomics analysis of human endothelial cell membrane rafts: evidence of MARCKS and MRP regulation in the sphingosine 1-phosphate-induced barrier enhancement. **Mol Cell Proteomics.** v. 6, p. 689-696, 2007.

GUO, Y. Y., ZHANG, J., ZHENG, Y. F., YANG, J. e ZHU, X. Q. Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells in vitro. **Mutat Res.** v. 721, p. 184-191, 2011.

GUPTA, V. R., WILSON, B. A. e BLANKE, S. R. Sphingomyelin is important for the cellular entry and intracellular localization of Helicobacter pylori VacA. **Cell Microbiol.** v. 12, p. 1517-1533, 2010.

GUYER, D. M., RADULOVIC, S., JONES, F. E. e MOBLEY, H. L. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic Escherichia coli, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. **Infect Immun.** v. 70, p. 4539-4546, 2002.

HANKINS, J. L., FOX, T. E., BARTH, B. M., UNRATH, K. A. e KESTER, M. Exogenous ceramide-1-phosphate reduces lipopolysaccharide (LPS)-mediated cytokine expression. **J Biol Chem.** v. 286, p. 44357-44366, 2011.

HANSEN, S. B. Lipid agonism: The PIP2 paradigm of ligand-gated ion channels. **Biochim Biophys Acta.** v. 1851, p. 620-628, 2015.

HAYAKAWA, M., JAYADEV, S., TSUJIMOTO, M., HANNUN, Y. A. e ITO, F. Role of ceramide in stimulation of the transcription of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 220, p. 681-686, 1996.

HEDGER, G. e SANSOM, M. S. Lipid interaction sites on channels, transporters and receptors: Recent insights from molecular dynamics simulations. **Biochim Biophys Acta.** v. 1858, p. 2390-2400, 2016.

HENRY, B., MOLLER, C., DIMANCHE-BOITREL, M. T., GULBINS, E. e BECKER, K. A. Targeting the ceramide system in cancer. **Cancer Lett.** v. 332, p. 286-294, 2013.

HERREROS, J., NG, T. e SCHIAVO, G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. **Mol Biol Cell.** v. 12, p. 2947-2960, 2001.

HIRAOKA, M., ABE, A. e SHAYMAN, J. A. Structure and function of lysosomal phospholipase A2: identification of the catalytic triad and the role of cysteine residues. **J Lipid Res.** v. 46, p. 2441-2447, 2005.

HOEFERLIN, L. A., WIJESINGHE, D. S. e CHALFANT, C. E. The role of ceramide-1-phosphate in biological functions. **Handb Exp Pharmacol.** v. p. 153-166, 2013.

HOGAN, C. J., BARBARO, K. C. e WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med.** v. 44, p. 608-624, 2004.

HORTA, C. C., OLIVEIRA-MENDES, B. B., DO CARMO, A. O., SIQUEIRA, F. F., BARROCA, T. M., DOS SANTOS NASSIF LACERDA, S. M., DE ALMEIDA CAMPOS, P. H., JR., DE FRANCA, L. R., FERREIRA, R. L. e KALAPOTHAKIS, E. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with loxosceles spider venom. **J Invest Dermatol.** v. 133, p. 1682-1685, 2013.

IACOVACHE, I., BISCHOFBERGER, M. e VAN DER GOOT, F. G. Structure and assembly of pore-forming proteins. **Curr Opin Struct Biol.** v. 20, p. 241-246, 2010.

INSEL, P. A., HEAD, B. P., PATEL, H. H., ROTH, D. M., BUNDEY, R. A. e SWANEY, J. S. Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. **Biochem Soc Trans.** v. 33, p. 1131-1134, 2005.

ISBISTER, G. K. e FAN, H. W. Spider bite. **Lancet.** v. 378, p. 2039-2047, 2011.

IVERSEN, T. G., SKRETTING, G., LLORENTE, A., NICOZIANI, P., VAN DEURS, B. e SANDVIG, K. Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. **Mol Biol Cell.** v. 12, p. 2099-2107, 2001.

KALAPOTHAKIS, E., CHATZAKI, M., GONCALVES-DORNELAS, H., DE CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., LABORNE, F. V., DE MOURA, J. F., VEIGA, S. S., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., GRANIER, C. e BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in Loxosceles intermedia (Mello-Leitao) venom. **Toxicon.** v. 50, p. 938-946, 2007.

KASLOW, H. R. e BURNS, D. L. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. **FASEB J.** v. 6, p. 2684-2690, 1992.

KATO, Y., LAMBERT, C. A., COLIGE, A. C., MINEUR, P., NOEL, A., FRANKENNE, F., FOIDART, J. M., BABA, M., HATA, R., MIYAZAKI, K. e TSUKUDA, M. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. **J Biol Chem.** v. 280, p. 10938-10944, 2005.

KIM, K. S., SENGUPTA, S., BERK, M., KWAK, Y. G., ESCOBAR, P. F., BELINSON, J., MOK, S. C. e XU, Y. Hypoxia enhances lysophosphatidic acid responsiveness in ovarian cancer cells and lysophosphatidic acid induces ovarian tumor metastasis in vivo. **Cancer Res.** v. 66, p. 7983-7990, 2006.

KISS, A. L. e BOTOS, E. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? **J Cell Mol Med.** v. 13, p. 1228-1237, 2009.

KITADOKORO, K., NISHIMURA, K., KAMITANI, S., FUKUI-MIYAZAKI, A., TOSHIMA, H., ABE, H., KAMATA, Y., SUGITA-KONISHI, Y., YAMAMOTO, S., KARATANI, H. e HORIGUCHI, Y. Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. **J Biol Chem.** v. 286, p. 19549-19555, 2011.

KOVBASNJUK, O., EDIDIN, M. e DONOWITZ, M. Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. **J Cell Sci.** v. 114, p. 4025-4031, 2001.

KRANTZ, B. A., FINKELSTEIN, A. e COLLIER, R. J. Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. **J Mol Biol.** v. 355, p. 968-979, 2006.

KUO, C. H. e WANG, W. C. Binding and internalization of Helicobacter pylori VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 303, p. 640-644, 2003.

KUSMA, J., CHAIM, O. M., WILLE, A. C., FERRER, V. P., SADE, Y. B., DONATTI, L., GREMSKI, W., MANGILI, O. C. e VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie.** v. 90, p. 1722-1736, 2008.

LAI, W. Q., MELENDEZ, A. J. e LEUNG, B. P. Role of sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in inflammatory arthritis. **World J Biol Chem.** v. 1, p. 321-326, 2010.

LAJOIE, D. M. e CORDES, M. H. Spider, bacterial and fungal phospholipase D toxins make cyclic phosphate products. **Toxicon.** v. 108, p. 176-180, 2015.

LAJOIE, D. M., ROBERTS, S. A., ZOBEL-THROPP, P. A., DELAHAYE, J. L., BANDARIAN, V., BINFORD, G. J. e CORDES, M. H. Variable Substrate Preference among Phospholipase D Toxins from Sicariid Spiders. **J Biol Chem.** v. 290, p. 10994-11007, 2015.

LAJOIE, D. M., ZOBEL-THROPP, P. A., KUMIROV, V. K., BANDARIAN, V., BINFORD, G. J. e CORDES, M. H. Phospholipase D toxins of brown spider venom convert lysophosphatidylcholine and sphingomyelin to cyclic phosphates. **PLoS One.** v. 8, p. e72372, 2013.

LAUVRAK, S. U., WALCHLI, S., IVERSEN, T. G., SLAGSVOLD, H. H., TORGERSEN, M. L., SPILSBERG, B. e SANDVIG, K. Shiga toxin regulates its entry in a Syk-dependent manner. **Mol Biol Cell.** v. 17, p. 1096-1109, 2006.

LEE, D. G., JEON, J. H., JANG, M. K., KIM, N. Y., LEE, J. H., KIM, S. J., KIM, G. D. e LEE, S. H. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. **Biotechnol Lett.** v. 29, p. 465-472, 2007.

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

LING, H., BOODHOO, A., HAZES, B., CUMMINGS, M. D., ARMSTRONG, G. D., BRUNTON, J. L. e READ, R. J. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. **Biochemistry.** v. 37, p. 1777-1788, 1998.

LINGWOOD, D., BINNINGTON, B., ROG, T., VATTULAINEN, I., GRZYBEK, M., COSKUN, U., LINGWOOD, C. A. e SIMONS, K. Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. **Nat Chem Biol.** v. 7, p. 260-262, 2011.

LINGWOOD, D., KAISER, H. J., LEVENTAL, I. e SIMONS, K. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. **Biochem Soc Trans.** v. 37, p. 955-960, 2009.

LINGWOOD, D. e SIMONS, K. Detergent resistance as a tool in membrane research. **Nat Protoc.** v. 2, p. 2159-2165, 2007.

LIU, S., MOAYERI, M. e LEPPLA, S. H. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. **Trends Microbiol.** v. 22, p. 317-325, 2014.

LUCIANO, M. N., DA SILVA, P. H., CHAIM, O. M., DOS SANTOS, V. L., FRANCO, C. R., SOARES, M. F., ZANATA, S. M., MANGILI, O. C., GREMSKI, W. e VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of Loxosceles intermedia (brown spider) venom in renal tissue. **J Histochem Cytochem.** v. 52, p. 455-467, 2004.

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

MACEYKA, M. e SPIEGEL, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. **Nature.** v. 510, p. 58-67, 2014.

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

MAGALHAES, G. S., CAPORRINO, M. C., DELLA-CASA, M. S., KIMURA, L. F., PREZOTTO-NETO, J. P., FUKUDA, D. A., PORTES-JUNIOR, J. A., NEVES-FERREIRA, A. G., SANTORO, M. L. e BARBARO, K. C. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from Loxosceles gaucho venom gland. **Biochimie.** v. 95, p. 1773-1783, 2013.

MAHFOUD, R., MANIS, A., BINNINGTON, B., ACKERLEY, C. e LINGWOOD, C. A. A major fraction of glycosphingolipids in model and cellular cholesterol-containing membranes is undetectable by their binding proteins. **J Biol Chem.** v. 285, p. 36049-36059, 2010.

MALAQUE, C. M., CASTRO-VALENCIA, J. E., CARDOSO, J. L., FRANCCA, F. O., BARBARO, K. C. e FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 44, p. 139-143, 2002.

MALAQUE, C. M., SANTORO, M. L., CARDOSO, J. L., CONDE, M. R., NOVAES, C. T., RISK, J. Y., FRANCA, F. O., DE MEDEIROS, C. R. e FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon.** v. 58, p. 664-671, 2011.

MARGHERI, G., D'AGOSTINO, R., TRIGARI, S., SOTTINI, S. e DEL ROSSO, M. The beta-subunit of cholera toxin has a high affinity for ganglioside GM1 embedded into solid supported lipid membranes with a lipid raft-like composition. **Lipids.** v. 49, p. 203-206, 2014.

MARONCLE, N. M., SIVICK, K. E., BRADY, R., STOKES, F. E. e MOBLEY, H. L. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic Escherichia coli. **Infect Immun.** v. 74, p. 6124-6134, 2006.

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

MATSUBARA, F. H., MEISSNER, G. O., HERZIG, V., JUSTA, H. C., DIAS, B. C., TREVISAN-SILVA, D., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M., KING, G. F. e VEIGA, S. S. Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from Loxosceles intermedia venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. **Insect Mol Biol.** v. p. 2016.

MCDADE, J., AYGUN, B. e WARE, R. E. Brown recluse spider (Loxosceles reclusa) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. **J Pediatr.** v. 156, p. 155-157, 2010.

MCGLASSON, D. L., HARROFF, H. H., SUTTON, J., DICK, E. e ELSTON, D. M. Cutaneous and systemic effects of varying doses of brown recluse spider venom in a rabbit model. **Clin Lab Sci.** v. 20, p. 99-105, 2007.

MCKENZIE, J., JOHANNES, L., TAGUCHI, T. e SHEFF, D. Passage through the Golgi is necessary for Shiga toxin B subunit to reach the endoplasmic reticulum. **FEBS J.** v. 276, p. 1581-1595, 2009.

MEGHA e LONDON, E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. **J Biol Chem.** v. 279, p. 9997-10004, 2004.

MEISSNER, G. O., DE RESENDE LARA, P. T., SCOTT, L. P., BRAZ, A. S., CHAVES-MOREIRA, D., MATSUBARA, F. H., SOARES, E. M., TREVISAN-SILVA, D., GREMSKI, L. H., VEIGA, S. S. e CHAIM, O. M. Molecular cloning and in silico characterization of knottin peptide, U2-SCRTX-Lit2, from brown spider (Loxosceles intermedia) venom glands. **J Mol Model.** v. 22, p. 196, 2016.

MELVIN, J. A., SCHELLER, E. V., MILLER, J. F. e COTTER, P. A. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. **Nat Rev Microbiol.** v. 12, p. 274-288, 2014.

MOAYERI, M., SASTALLA, I. e LEPPLA, S. H. Anthrax and the inflammasome. **Microbes Infect.** v. 14, p. 392-400, 2012.

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

MOOLENAAR, W. H. Lysophosphatidic acid signalling. **Curr Opin Cell Biol.** v. 7, p. 203-210, 1995.

MORENO-GARCIA, M. E., LOPEZ-BOJORQUES, L. N., ZENTELLA, A., HUMPHRIES, L. A., RAWLINGS, D. J. e SANTOS-ARGUMEDO, L. CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)-gamma 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade. **J Immunol.** v. 174, p. 2687-2695, 2005.

MORGON, A. M., BELISARIO-FERRARI, M. R., TREVISAN-SILVA, D., MEISSNER, G. O., VUITIKA, L., MARIN, B., TASHIMA, A. K., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., VEIGA, S. S. e CHAIM, O. M. Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (Loxosceles intermedia) venom. **Biochimie.** v. p. 2016.

MUNRO, S. Lipid rafts: elusive or illusive? **Cell.** v. 115, p. 377-388, 2003.

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

MURAKAMI, M. T., FERNANDES-PEDROSA, M. F., TAMBOURGI, D. V. e ARNI, R. K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. **J Biol Chem.** v. 280, p. 13658-13664, 2005.

MURPH, M., TANAKA, T., LIU, S. e MILLS, G. B. Of spiders and crabs: the emergence of lysophospholipids and their metabolic pathways as targets for therapy in cancer. **Clin Cancer Res.** v. 12, p. 6598-6602, 2006.

NAKAMURA, H. e MURAYAMA, T. Role of sphingolipids in arachidonic acid metabolism. **J Pharmacol Sci.** v. 124, p. 307-312, 2014.

NAKAMURA, Y., AWAI, K., MASUDA, T., YOSHIOKA, Y., TAKAMIYA, K. e OHTA, H. A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in Arabidopsis. **J Biol Chem.** v. 280, p. 7469-7476, 2005.

NOWATZKI, J., DE SENE, R. V., PALUDO, K. S., VEIGA, S. S., OLIVER, C., JAMUR, M. C., NADER, H. B., TRINDADE, E. S. e 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.

NOWATZKI, J., SENE, R. V., PALUDO, K. S., RIZZO, L. E., SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F., VEIGA, S. S., NADER, H. B., FRANCO, C. R. e TRINDADE, E. S. Brown spider (Loxosceles intermedia) venom triggers endothelial cells death by anoikis. **Toxicon.** v. 60, p. 396-405, 2012.

OLLIVIER-BOUSQUET, M., RADVANYI, F. e BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from snake venom, interacts with epithelial mammary cells, is internalized and induces secretion. **Mol Cell Endocrinol.** v. 82, p. 41-50, 1991.

OPITZ, B., EITEL, J., MEIXENBERGER, K. e SUTTORP, N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. **Thromb Haemost.** v. 102, p. 1103-1109, 2009.

ORLANDI, P. A. e FISHMAN, P. H. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. **J Cell Biol.** v. 141, p. 905-915, 1998.

PALUDO, K. S., BISCAIA, S. M., CHAIM, O. M., OTUKI, M. F., NALIWAIKO, K., DOMBROWSKI, P. A., FRANCO, C. R. e VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v. 149, p. 323-333, 2009.

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

PARTON, R. G. e RICHARDS, A. A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. **Traffic.** v. 4, p. 724-738, 2003.

PARTON, R. G. e SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 8, p. 185-194, 2007.

PELKMANS, L. e ZERIAL, M. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. **Nature.** v. 436, p. 128-133, 2005.

PETERSEN, A. M., SORENSEN, K., BLOM, J. e KROGFELT, K. A. Reduced intracellular survival of Helicobacter pylori vacA mutants in comparison with their wild-types indicates the role of VacA in pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 30, p. 103-108, 2001.

PETTUS, B. J., BIELAWSKA, A., SPIEGEL, S., RODDY, P., HANNUN, Y. A. e CHALFANT, C. E. Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. **J Biol Chem.** v. 278, p. 38206-38213, 2003.

PETTUS, B. J., BIELAWSKA, A., SUBRAMANIAN, P., WIJESINGHE, D. S., MACEYKA, M., LESLIE, C. C., EVANS, J. H., FREIBERG, J., RODDY, P., HANNUN, Y. A. e CHALFANT, C. E. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. **J Biol Chem.** v. 279, p. 11320-11326, 2004.

PETTUS, B. J., KITATANI, K., CHALFANT, C. E., TAHA, T. A., KAWAMORI, T., BIELAWSKI, J., OBEID, L. M. e HANNUN, Y. A. The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate. **Mol Pharmacol.** v. 68, p. 330-335, 2005.

PLATNICK, N. I. The world spider catalog, version 17.5. v. American Museum of Natural History, online at http://www.wsc.nmbe.ch/, p. 2016.

PLAUT, R. D. e CARBONETTI, N. H. Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell. **Cell Microbiol.** v. 10, p. 1130-1139, 2008.

POBER, J. S. e SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol.** v. 7, p. 803-815, 2007.

POVEDA, J. A., GIUDICI, A. M., RENART, M. L., MOLINA, M. L., MONTOYA, E., FERNANDEZ-CARVAJAL, A., FERNANDEZ-BALLESTER, G., ENCINAR, J. A. e GONZALEZ-ROS, J. M. Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. **Biochim Biophys Acta.** v. 1838, p. 1560-1567, 2014.

POWNER, D. J., PAYNE, R. M., PETTITT, T. R., GIUDICI, M. L., IRVINE, R. F. e WAKELAM, M. J. Phospholipase D2 stimulates integrin-mediated adhesion via phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Igamma b. **J Cell Sci.** v. 118, p. 2975-2986, 2005.

PUSTILNIK, T. B., ESTRELLA, V., WIENER, J. R., MAO, M., EDER, A., WATT, M. A., BAST, R. C., JR. e MILLS, G. B. Lysophosphatidic acid induces urokinase secretion by ovarian cancer cells. **Clin Cancer Res.** v. 5, p. 3704-3710, 1999.

RAMOS-CERRILLO, B., OLVERA, A., ODELL, G. V., ZAMUDIO, F., PANIAGUA-SOLIS, J., ALAGON, A. e STOCK, R. P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders Loxosceles boneti and Loxosceles reclusa. **Toxicon.** v. 44, p. 507-514, 2004.

RAPOSO, G. e STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol.** v. 200, p. 373-383, 2013.

RASH, L. D. e HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon.** v. 40, p. 225-254, 2002.

RASSOW, J. e MEINECKE, M. Helicobacter pylori VacA: a new perspective on an invasive chloride channel. **Microbes Infect.** v. 14, p. 1026-1033, 2012.

RASTOGI, B. K. e NORDOY, A. Lipid composition of cultured human endothelial cells. **Thromb Res.** v. 18, p. 629-641, 1980.

RIBEIRO, R. O., CHAIM, O. M., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, L. H., SADE, Y. B., PALUDO, K. S., SENFF-RIBEIRO, A., DE MOURA, J., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., GREMSKI, W., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Toxicon.** v. 50, p. 1162-1174, 2007.

RICCI, V., GALMICHE, A., DOYE, A., NECCHI, V., SOLCIA, E. e BOQUET, P. High cell sensitivity to Helicobacter pylori VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. **Mol Biol Cell.** v. 11, p. 3897-3909, 2000.

RIDDELL, D. R., CHRISTIE, G., HUSSAIN, I. e DINGWALL, C. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. **Curr Biol.** v. 11, p. 1288-1293, 2001.

RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J. e MINOR, L. (2004). Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual. SITTAMPALAM, G. S., COUSSENS, N. P., NELSON, H. et al. Bethesda (MD).
RIVERA, I. G., ORDONEZ, M., PRESA, N., GOMEZ-LARRAURI, A., SIMON, J., TRUEBA, M. e GOMEZ-MUNOZ, A. Sphingomyelinase D/ceramide 1-phosphate in cell survival and inflammation. **Toxins (Basel).** v. 7, p. 1457-1466, 2015.

RODRIGUEZ-MENCHACA, A. A., ADNEY, S. K., ZHOU, L. e LOGOTHETIS, D. E. Dual Regulation of Voltage-Sensitive Ion Channels by PIP(2). **Front Pharmacol.** v. 3, p. 170, 2012.

ROSEN, J. L., DUMITRU, J. K., LANGLEY, E. W. e MEADE OLIVIER, C. A. Emergency department death from systemic loxoscelism. **Ann Emerg Med.** v. 60, p. 439-441, 2012.

ROVIEZZO, F., BRANCALEONE, V., DE GRUTTOLA, L., VELLECCO, V., BUCCI, M., D'AGOSTINO, B., COOPER, D., SORRENTINO, R., PERRETTI, M. e CIRINO, G. Sphingosine-1-phosphate modulates vascular permeability and cell recruitment in acute inflammation in vivo. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 337, p. 830-837, 2011.

RUDGE, S. A. e WAKELAM, M. J. Inter-regulatory dynamics of phospholipase D and the actin cytoskeleton. **Biochim Biophys Acta.** v. 1791, p. 856-861, 2009.

SADE, Y. B., BOIA-FERREIRA, M., GREMSKI, L. H., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M. e VEIGA, S. S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 44, p. 170-177, 2012.

SANDVIG, K., BERGAN, J., KAVALIAUSKIENE, S. e SKOTLAND, T. Lipid requirements for entry of protein toxins into cells. **Prog Lipid Res.** v. 54, p. 1-13, 2014.

SANDVIG, K., SPILSBERG, B., LAUVRAK, S. U., TORGERSEN, M. L., IVERSEN, T. G. e VAN DEURS, B. Pathways followed by protein toxins into cells. **Int J Med Microbiol.** v. 293, p. 483-490, 2004.

SANO, T., BAKER, D., VIRAG, T., WADA, A., YATOMI, Y., KOBAYASHI, T., IGARASHI, Y. e TIGYI, G. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. **J Biol Chem.** v. 277, p. 21197-21206, 2002.

SCHAPIRO, F. B., LINGWOOD, C., FURUYA, W. e GRINSTEIN, S. pH-independent retrograde targeting of glycolipids to the Golgi complex. **Am J Physiol.** v. 274, p. C319-332, 1998.

SCHONBERGER, T., JURGENS, T., MULLER, J., ARMBRUSTER, N., NIERMANN, C., GORRESSEN, S., SOMMER, J., TIAN, H., DI PAOLO, G., SCHELLER, J., FISCHER, J. W., GAWAZ, M. e ELVERS, M. Pivotal role of phospholipase D1 in tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation and scar formation after myocardial ischemia and reperfusion in mice. **Am J Pathol.** v. 184, p. 2450-2464, 2014.

SCHROEDER, F. C., TAGGI, A. E., GRONQUIST, M., MALIK, R. U., GRANT, J. B., EISNER, T. e MEINWALD, J. NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 105, p. 14283-14287, 2008.

SCHUBERT, W., FRANK, P. G., RAZANI, B., PARK, D. S., CHOW, C. W. e LISANTI, M. P. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. **J Biol Chem.** v. 276, p. 48619-48622, 2001.

SCHUCK, S., HONSHO, M., EKROOS, K., SHEVCHENKO, A. e SIMONS, K. Resistance of cell membranes to different detergents. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 100, p. 5795-5800, 2003.

SENFF-RIBEIRO, A., HENRIQUE DA SILVA, P., CHAIM, O. M., GREMSKI, L. H., PALUDO, K. S., BERTONI DA SILVEIRA, R., GREMSKI, W., MANGILI, O. C. e VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (Loxosceles genus) venom toxins. **Biotechnol Adv.** v. 26, p. 210-218, 2008.

SEZERINO, U. M., ZANNIN, M., COELHO, L. K., GONCALVES JUNIOR, J., GRANDO, M., MATTOSINHO, S. G., CARDOSO, J. L., VON EICKSTEDT, V. R., FRANCA, F. O., BARBARO, K. C. e FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of Loxosceles spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 92, p. 546-548, 1998.

SHOGOMORI, H. e FUTERMAN, A. H. Cholera toxin is found in detergent-insoluble rafts/domains at the cell surface of hippocampal neurons but is internalized via a raft-independent mechanism. **J Biol Chem.** v. 276, p. 9182-9188, 2001.

SIMANSHU, D. K., KAMLEKAR, R. K., WIJESINGHE, D. S., ZOU, X., ZHAI, X., MISHRA, S. K., MOLOTKOVSKY, J. G., MALININA, L., HINCHCLIFFE, E. H., CHALFANT, C. E., BROWN, R. E. e PATEL, D. J. Non-vesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids. **Nature.** v. 500, p. 463-467, 2013.

SIMONS, K. e IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature.** v. 387, p. 569-572, 1997.

SIMONS, M. e RAPOSO, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. **Curr Opin Cell Biol.** v. 21, p. 575-581, 2009.

SLATER, L. H., CLATWORTHY, A. E. e HUNG, D. T. Bacterial toxins and small molecules elucidate endosomal trafficking. **Trends Microbiol.** v. 22, p. 53-55, 2014.

SONG, K. S., LI, S., OKAMOTO, T., QUILLIAM, L. A., SARGIACOMO, M. e LISANTI, M. P. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. **J Biol Chem.** v. 271, p. 9690-9697, 1996.

SOWA, G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. **Front Physiol.** v. 2, p. 120, 2012.

SPOONER, R. A., SMITH, D. C., EASTON, A. J., ROBERTS, L. M. e LORD, J. M. Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. **Virol J.** v. 3, p. 26, 2006.

SPRENGER, R. R., FONTIJN, R. D., VAN MARLE, J., PANNEKOEK, H. e HORREVOETS, A. J. Spatial segregation of transport and signalling functions between human endothelial caveolae and lipid raft proteomes. **Biochem J.** v. 400, p. 401-410, 2006.

STEIN, P. E., BOODHOO, A., ARMSTRONG, G. D., COCKLE, S. A., KLEIN, M. H. e READ, R. J. The crystal structure of pertussis toxin. **Structure.** v. 2, p. 45-57, 1994.

STOCK, R. P., BREWER, J., WAGNER, K., RAMOS-CERRILLO, B., DUELUND, L., JERNSHOJ, K. D., OLSEN, L. F. e BAGATOLLI, L. A. Sphingomyelinase D activity in model membranes: structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. **PLoS One.** v. 7, p. e36003, 2012.

STODDARD, N. C. e CHUN, J. Promising pharmacological directions in the world of lysophosphatidic Acid signaling. **Biomol Ther (Seoul).** v. 23, p. 1-11, 2015.

STRAUS, A. H., LEVERY, S. B., JASIULIONIS, M. G., SALYAN, M. E., STEELE, S. J., TRAVASSOS, L. R., HAKOMORI, S. e TAKAHASHI, H. K. Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms of Leishmania (L.) amazonensis. Immunogenicity and role in parasite binding and invasion of macrophages. **J Biol Chem.** v. 268, p. 13723-13730, 1993.

SUBRAMANIAN, P., STAHELIN, R. V., SZULC, Z., BIELAWSKA, A., CHO, W. e CHALFANT, C. E. Ceramide 1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A2 alpha and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine. **J Biol Chem.** v. 280, p. 17601-17607, 2005.

SZMITKO, P. E., WANG, C. H., WEISEL, R. D., DE ALMEIDA, J. R., ANDERSON, T. J. e VERMA, S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. **Circulation.** v. 108, p. 1917-1923, 2003.

TAMBOURGI, D. V., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M. e VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon.** v. 56, p. 1113-1119, 2010.

TAMBOURGI, D. V., MORGAN, B. P., DE ANDRADE, R. M., MAGNOLI, F. C. e VAN DEN BERG, C. W. Loxosceles intermedia spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood.** v. 95, p. 683-691, 2000.

TIRUPPATHI, C., SONG, W., BERGENFELDT, M., SASS, P. e MALIK, A. B. Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. **J Biol Chem.** v. 272, p. 25968-25975, 1997.

TOLEDO, M. S., SUZUKI, E., STRAUS, A. H. e TAKAHASHI, H. K. Glycolipids from Paracoccidioides brasiliensis. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol.** v. 33, p. 247-251, 1995.

TORGERSEN, M. L., SKRETTING, G., VAN DEURS, B. e SANDVIG, K. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. **J Cell Sci.** v. 114, p. 3737-3747, 2001.

TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRUGGER, B. e SIMONS, M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. **Science.** v. 319, p. 1244-1247, 2008.

TREVISAN-SILVA, D., BEDNASKI, A. V., GREMSKI, L. H., CHAIM, O. M., VEIGA, S. S. e SENFF-RIBEIRO, A. Differential metalloprotease content and activity of three Loxosceles spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon.** v. 76, p. 11-22, 2013.

TREVISAN-SILVA, D., GREMSKI, L. H., CHAIM, O. M., DA SILVEIRA, R. B., MEISSNER, G. O., MANGILI, O. C., BARBARO, K. C., GREMSKI, W., VEIGA, S. S. e SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus Loxosceles). **Biochimie.** v. 92, p. 21-32, 2010.

TSUKAHARA, T. PPAR gamma Networks in Cell Signaling: Update and Impact of Cyclic Phosphatidic Acid. **J Lipids.** v. 2013, p. 246597, 2013.

TURK, B. e TURK, V. Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? **J Biol Chem.** v. 284, p. 21783-21787, 2009.

ULLAH, M., COX, S., KELLY, E., BOADLE, R. e ZOELLNER, H. Arecoline is cytotoxic for human endothelial cells. **J Oral Pathol Med.** v. 43, p. 761-769, 2014.

UTSKARPEN, A., MASSOL, R., VAN DEURS, B., LAUVRAK, S. U., KIRCHHAUSEN, T. e SANDVIG, K. Shiga toxin increases formation of clathrin-coated pits through Syk kinase. **PLoS One.** v. 5, p. e10944, 2010.

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

VEIGA, S. S., DA SILVEIRA, R. B., DREYFUS, J. L., HAOACH, J., PEREIRA, A. M., MANGILI, O. C. e GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Toxicon.** v. 38, p. 825-839, 2000a.

VEIGA, S. S., FEITOSA, L., DOS SANTOS, V. L., DE SOUZA, G. A., RIBEIRO, A. S., MANGILI, O. C., PORCIONATTO, M. A., NADER, H. B., DIETRICH, C. P., BRENTANI, R. R. e GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J.** v. 32, p. 397-408, 2000b.

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

VEIGA, S. S., ZANETTI, V. C., FRANCO, C. R., TRINDADE, E. S., PORCIONATTO, M. A., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P. e NADER, H. B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res.** v. 102, p. 229-237, 2001b.

VETTER, R. S. Seasonality of brown recluse spiders, Loxosceles reclusa, submitted by the general public: implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses. **Toxicon.** v. 58, p. 623-625, 2011.

VETTER, R. S. e ISBISTER, G. K. Medical aspects of spider bites. **Annu Rev Entomol.** v. 53, p. 409-429, 2008.

VUITIKA, L., GREMSKI, L. H., BELISARIO-FERRARI, M. R., CHAVES-MOREIRA, D., FERRER, V. P., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M. e VEIGA, S. S. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: identification and functional characterization. **J Cell Biochem.** v. 114, p. 2479-2492, 2013.

WANG, X. L., YE, D., PETERSON, T. E., CAO, S., SHAH, V. H., KATUSIC, Z. S., SIECK, G. C. e LEE, H. C. Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K+ channels in vascular endothelial cells. **J Biol Chem.** v. 280, p. 11656-11664, 2005.

WIJESINGHE, D. S., ALLEGOOD, J. C., GENTILE, L. B., FOX, T. E., KESTER, M. e CHALFANT, C. E. Use of high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of ceramide-1-phosphate levels. **J Lipid Res.** v. 51, p. 641-651, 2010.

WILLE, A. C., CHAVES-MOREIRA, D., TREVISAN-SILVA, D., MAGNONI, M. G., BOIA-FERREIRA, M., GREMSKI, L. H., GREMSKI, W., CHAIM, O. M., SENFF-RIBEIRO, A. e VEIGA, S. S. 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, 2013.

WILLIAMS, J. P., SMITH, D. C., GREEN, B. N., MARSDEN, B. D., JENNINGS, K. R., ROBERTS, L. M. e SCRIVENS, J. H. Gas phase characterization of the noncovalent quaternary structure of cholera toxin and the cholera toxin B subunit pentamer. **Biophys J.** v. 90, p. 3246-3254, 2006.

WU, L., BAUER, C. S., ZHEN, X. G., XIE, C. e YANG, J. Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P2. **Nature.** v. 419, p. 947-952, 2002.

WU, M., MING, W., TANG, Y., ZHOU, S., KONG, T. e DONG, W. The anticancer effect of cytotoxin 1 from Naja atra Cantor venom is mediated by a lysosomal cell death pathway involving lysosomal membrane permeabilization and cathepsin B release. **Am J Chin Med.** v. 41, p. 643-663, 2013.

YAHI, N., AULAS, A. e FANTINI, J. How cholesterol constrains glycolipid conformation for optimal recognition of Alzheimer's beta amyloid peptide (Abeta1-40). **PLoS One.** v. 5, p. e9079, 2010.

YAHIRO, K., WADA, A., YAMASAKI, E., NAKAYAMA, M., NISHI, Y., HISATSUNE, J., MORINAGA, N., SAP, J., NODA, M., MOSS, J. e HIRAYAMA, T. Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. **J Biol Chem.** v. 279, p. 51013-51021, 2004.

YAMAWAKI, H. e IWAI, N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 290, p. C1495-1502, 2006.

YANG, L., ANDREWS, D. A. e LOW, P. S. Lysophosphatidic acid opens a Ca(++) channel in human erythrocytes. **Blood.** v. 95, p. 2420-2425, 2000.

YONEYAMA, K. A., TANAKA, A. K., SILVEIRA, T. G., TAKAHASHI, H. K. e STRAUS, A. H. Characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **J Lipid Res.** v. 47, p. 2171-2178, 2006.

YOUNG, A. R. e 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, p. 391-400, 2001.

YUNG, Y. C., STODDARD, N. C. e CHUN, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. **J Lipid Res.** v. 55, p. 1192-1214, 2014.

ZANETTI, V. C., DA SILVEIRA, R. B., DREYFUSS, J. L., HAOACH, J., MANGILI, O. C., VEIGA, S. S. e GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coagul Fibrinolysis.** v. 13, p. 135-148, 2002.

ZHAO, C., HUI, W., FERNANDES, M. J., POUBELLE, P. E. e BOURGOIN, S. G. Lysophosphatidic acid-induced IL-8 secretion involves MSK1 and MSK2 mediated activation of CREB1 in human fibroblast-like synoviocytes. **Biochem Pharmacol.** v. 90, p. 62-72, 2014.

ZITZER, A., PALMER, M., WELLER, U., WASSENAAR, T., BIERMANN, C., TRANUM-JENSEN, J. e BHAKDI, S. Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by Vibrio cholerae cytolysin (hemolysin). **Eur J Biochem.** v. 247, p. 209-216, 1997.

ANEXO I

TABELA 2 – CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA LALP3 EM SISTEMA PROCARIÓTICO (CEPAS DE *E. coli*)

Construção	Cepa	Meio de cultura	[ ] IPTG	Temp.	Expressão
LALP3 madura/SUMO	Shuffle T7 Express LysY	Triptona-Fosfato	1mM	30°C	4h
LALP3 madura/SUMO	BL21 (DE3) Star	Triptona-Fosfato	0,05mM	30°C	4h

TABELA 3 – CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DA LALP3 EM SISTEMA EUCARIÓTICO (CEPAS DE *Pichia pastoris*)

Construção	Cepa	Meio de Cultura	Temp.	Expressão	Rendimento
Pró-LALP3/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 0,5%)	30°C	96h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 0,5%)	30°C	96h	Não detectado
Pró-LALP3/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 0,5%)	30°C	96h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 0,5%)	30°C	96h	Não detectado
Pró-LALP3/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 1%)	30°C	96h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 1%)	30°C	96h	Não detectado

CONTINUAÇÃO DA TABELA 3

Construção	Cepa	Meio de Cultura	Temp.	Expressão	Rendimento
Pró-LALP3/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 1% - pH 3,0)	30°C	96h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 1% -pH 3,0)	30°C	96h	Não detectado
Pró-LALP3/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 3%)	30°C	72h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	X-33	BMMY (Metanol 3%)	30°C	72h	Não detectado
Pró-LALP3/pPICZαC	KM71H	BMMY (Metanol 0,5%)	30°C	216h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	KM71H	BMMY (Metanol 0,5%)	30°C	216h	Não detectado
Pró-LALP3/pPICZαC	KM71H	BMMY (Metanol 1%)	30°C	216h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	KM71H	BMMY (Metanol 1%)	30°C	216h	Não detectado
Pró-LALP3/pPICZαC	SMD1186H	BMMY (Metanol 1%)	30°C	216h	Não detectado
LALP3 madura/pPICZαC	SMD1168H	BMMY (Metanol 1%)	30°C	216h	Não detectado

ANEXO II

Publicação de artigo científico em 2016 com título:

Expressão e reatividade cruzada imunológica da LALP3, uma nova metalloprotease do tipo astacina do veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)

Resumo

O veneno de aranhas *Loxosceles* é compost por uma complexa mistura de toxinas biologicamente ativas, em sua maioria consistindo componentes de baixa massa molecular (2-40 kDa). Entre estes, isoformas de metaloproteases do tipo astacina foram identificadas por meio de análises de transcriptoma e proteoma. Apenas a LALP1 (*Loxosceles Astacin-Like Protease 1*) foi caracterizada. Neste artigo a LALP3 foi caracterizada como uma nova isoforma de metaloprotease do tipo astacina recombinante do veneno de *Loxosceles intermedia*. O cDNA da LALP3 foi clonado no vetor pET-SUMO, e sua expressão heteróloga solúvel foi realizada usando uma etiqueta de solubilidade SUMO adicionada à LALP3 para atingir solubilidade em *E. coli* Shuffle T7 Express LysY, a qual expressa a ponte dissulfeto isomerase DsbC. A purificação da proteína foi realizda or resina de Ni-NTA Agarose e avaliada por SDS-PAGE sob condições redutoras. Análises de *imunoblotting* foram realizadas com anticorpos específicos que reconhecem a LALP1 e o veneno total. Análises por *western-blotting* evidenciaram epítopos lineares da LALP3 recombinante que reconheceram a LALP1, e análises por *dot-blotting* revelaram epitopos conformacionais reconhecidos pelas astacinas do veneno. A análise por espectrofotometria de massa revelou que a proteína recombinante expressa é uma metaloprotease do tipo astacina do veneno de *L. intermedia.* Ainda, a modelagem molecular da LALP3 evidenciou que esta isoforma contém os motivos de ligação ao zinco e a volta de metionina formando o sítio ativo, como foi observado para as astacinas. Estes dados confirmaram que a LALP3, a qual foi obtida com sucesso por expressão heteróloga usando um sistema procariótico, é uma nova isoforma de metaloprotease do tipo astacina presente no veneno de *L. intermedia*

Revista: Biochimie

Publicação de artigo científico em 2015 com título:

Toxinas do veneno de aranha-marrom (Gênero *Loxosceles)*: Avaliação da conservação biológica por reatividade cruzada imunológica

Resumo

As aranhas *Loxosceles* são responsáveis por graves acidentes com humanos por todo o mundo. O conjunto de sintomas encontrados nas vítimas após o envenenamento é chamado de loxoscelismo e é caracterizado por duas condições clínicas: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico. O único tratamento específico é a soroterapia, onde um anti-soro produzido com o veneno de *Loxosceles* é administrado nas vítimas após os acidentes com as aranhas. O objetivo deste trabalho foi melhorar o conhecimento relacionado à relação imunológica entre as toxinas dos venenos das espécies epidemiológicas mais importantes no Brasil (*Loxosceles intermedia, Loxosceles gaucho e Loxosceles laeta).* Imunoensaios usando os venenos das aranhas e toxinas recombinantes de *L. intermedia* foram realizados e sua reatividade cruzada avaliada. A conservação biológica das principais toxinas de *Loxosceles* (Fosfolipases-D, Metaloproteases do tipo astacina, hialuronidases, peptídeo inseticida ICK e fator liberador de histamina TCTP) foi investigada. Uma análise *in silico* the epítopos putativos foi realizada e discutida em relação aos resultados experimentais. Os dados apresentados representam uma investigação imunológica em relação à conservação biológica no gênero *Loxosceles*. Os resultados revelam novas perspectivas para as toxinas do veneno de aranhas-marrons, no que tange o estudo, diagnóstico e tratamento do loxoscelismo e possíveis aplicações biotecnológicas considerando as características imunológicas conservadas das toxinas.

Revista: Toxicon

Biochimie 128-129 (2016) 8–19

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom

Adriano M. Morgon [a], Matheus R. Belisario-Ferrari [a], Dilza Trevisan-Silva [a], Gabriel O. Meissner [a], Larissa Vuitika [a], Brenda Marin [a], Alexandre K. Tashima [d], Luiza H. Gremski [a, b], Waldemiro Gremski [a, c], Andrea Senff-Ribeiro [a], Silvio S. Veiga [a], Olga M. Chaim [a, *]

[a] Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
[b] Department of Clinical Pathology, Clinics Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
[c] Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil
[d] Department of Biochemistry, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 April 2016
Accepted 6 June 2016
Available online 23 June 2016

Keywords:
Loxosceles intermedia
Venom
Astacin
Metalloprotease
Toxin
Recombinant protein

ABSTRACT

Loxosceles spiders' venom comprises a complex mixture of biologically active toxins, mostly consisting of low molecular mass components (2–40 kDa). Amongst, isoforms of astacin-like metalloproteases were identified through transcriptome and proteome analyses. Only LALP1 (*Loxosceles* Astacin-Like protease 1) has been characterized. Herein, we characterized LALP3 as a novel recombinant astacin-like metalloprotease isoform from *Loxosceles intermedia* venom. LALP3 cDNA was cloned in pET-SUMO vector, and its soluble heterologous expression was performed using a SUMO tag added to LALP3 to achieve solubility in *Escherichia coli* SHuffle T7 Express LysY cells, which express the disulfide bond isomerase DsbC. Protein purification was conducted by Ni-NTA Agarose resin and assayed for purity by SDS-PAGE under reducing conditions. Immunoblotting analyses were performed with specific antibodies recognizing LALP1 and whole venom. Western blotting showed linear epitopes from recombinant LALP3 that cross-reacted with LALP1, and dot blotting revealed conformational epitopes with native venom astacins. Mass spectrometry analysis revealed that the recombinant expressed protein is an astacin-like metalloprotease from *L. intermedia* venom. Furthermore, molecular modeling of LALP3 revealed that this isoform contains the zinc binding and Met-turn motifs, forming the active site, as has been observed in astacins. These data confirmed that LALP3, which was successfully obtained by heterologous expression using a prokaryote system, is a new astacin-like metalloprotease isoform present in *L. intermedia* venom.

© 2016 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Loxoscelism, or necrotic arachnidism, refers to the clinical manifestations that result from envenomation after *Loxosceles* genus spiders. Loxoscelism is characterized by skin injuries at the venom inoculation site, including swelling, erythema, hemorrhage, and dermonecrosis, a hallmark of loxoscelism, that presents gravitational spreading of the cutaneous lesion [1,2]. At the systemic level, symptoms and disturbances such as fever, malaise, weakness, nausea, vomiting in severe cases, and seldomly, disseminated intravascular coagulation, hemolysis, and acute renal failure, have been reported [1–5].

The venom of *Loxosceles* genus spiders is a crystalline fluid comprising a pool of molecules such as enzymes, peptides and nucleotides produced by a pair of glands on the cephalothorax of the animal [1,6,7]. The venom mainly comprises low molecular mass toxins (2–40 kDa) [1,6,8,9]. Several toxins such as alkaline phosphatases [2], hyaluronidases [10–13], phospholipases-D/sphingomyelinases-D, also named dermonecrotic toxins [14–18],

* Corresponding author. Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.
E-mail address: olgachaim@ufpr.br (O.M. Chaim).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.003
0300-9084/© 2016 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

serine proteases [19], insecticidal peptides [20,21] and metalloproteases [7,22–24] have been identified.

Initial studies involving *Loxosceles intermedia* crude venom allowed for the detection of proteases with activity upon extracellular matrix components. Two proteases capable of hydrolyzing fibrinogen, fibronectin and gelatin, named Loxolisin A (20–28 kDa) and Loxolisin B (30–32 kDa), were identified. Because the activity of these enzymes was inhibited by metal chelators such as 1,10-phenantroline and EDTA, they were characterized as metalloproteases [7].

Additional data obtained with *L. intermedia* crude venom revealed the activity of the spider toxins upon extracellular matrix molecules under *in vitro* and *in vivo* conditions. Proteases from spider electro-stimulated crude venom have been suggested to cause disruption of the basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm tumor cells (EHS), with the report of hydrolysis of the protein core of heparan sulfate molecules and entactin, the last caused by metalloproteases [22]. Also, proteolytic activity on the sub-endothelial blood vessel basement membrane and extracellular matrix of endothelial cells was demonstrated in cell cultures [24]. Proteases from the venom were also able to promote morphological alterations to the blood vessel endothelium with disruption of the subendothelial basement membrane, formation of fibrin networks and thrombus formation inside blood vessels. The authors also reported a 30-kDa protease with fibrinogenolytic activity that could possibly be related to hemorrhagic disturbances during loxoscelism [25].

The *in vivo* assays revealed the action of *L. intermedia* venom upon kidney structures. Evidence of glomerular disturbances was determined by the observations of podocyte cytotoxicity, detached fenestrated endothelial cells from the subendothelial basement membrane, and reduction in the basement membrane thickness. Moreover, evidence of tubular cell necrosis was visualized by the presence of blebs on the cell membrane, damaged mitochondria, prominent smooth endoplasmic reticulum and autophagosome formation [26].

The previous studies performed with electro-stimulated venom, along with the analysis of the toxins from *L. intermedia* venom glands, confirmed that the aforementioned metalloproteases really are toxins of brown spider venom [8]. Additionally, by using a cDNA library from the *L. intermedia* venom glands, a metalloprotease capable of hydrolyzing fibrinogen, fibronectin and gelatin was cloned, heterologously expressed and functionally characterized. The enzyme was identified as an astacin-like protease and named Loxosceles Astacin-Like Protease (LALP). Remarkably, LALP was the first astacin-like toxin described in animal venoms [27].

Transcriptome analysis of *L. intermedia* venom glands revealed other toxins such as translationally controlled tumor protein (TCTP), knottin-like insecticidal peptides, neurotoxins similar to Magi-3, allergens, serine protease inhibitors, and astacin-like metalloproteases, the last comprising more than 22% of the transcripts coding for toxins [28–31]. Additionally, 1DE and 2DE immunoblotting and gelatin zymography showed that astacin-like metalloproteases represent a family of toxins present in *L. laeta, L. gaucho* and *L. intermedia* venoms [32,33]. Taken together, transcriptome and proteome analyses suggest the high biological relevance of astacin-like metalloproteases as components of *Loxosceles* spiders venoms. To strengthen the biological relevance and provide evidence for the conserved nature of these proteases as components of *Loxosceles* spiders venoms, it was demonstrated that metalloproteases are present in the venom of different species such as *L. intermedia, L. gaucho, L. deserta, L. laeta,* and *L. recluse* [10]. Also, proteases with caseinolytic, gelatinolytic, and fibrinogenolytic activities were proven to be components of *L. rufescens* venom [13], and proteases with fibrinogenolytic activity were detected in *L. gaucho* and *L. laeta* venoms [25]. The presence of astacin-like metalloproteases was reported in the venom of spiders not of the *Loxosceles* genus. Transcriptome and proteome analyses of the *Scytodes thoracica* and *Plectreurys tristis* venom glands also revealed that this class of proteases can be found among other spiders venoms [34,35].

Astacin metalloproteases are secreted or membrane-bound multi-domain enzymes that constitute the astacin family of zinc-dependent endopeptidases. Following the identification of the first astacin, named after the prototypical digestive protease from the crayfish *Astacus astacus*, several other members of the family emerged, being found in a myriad of organisms from bacteria to humans [36,37]. These enzymes are structurally related proteases characterized by the Zinc-Binding Consensus Sequence (HEXXHXXGXXHE) and the Met-turn motif (SXMHY), both of which are key elements for the activities of these enzymes [38–40].

Several studies demonstrated that these proteases have manifold functions in metabolism and are related to the proteolysis of extracellular matrix components. Enzymes such as UVS.2 (claw frog), LCE and HCE (medaka fish), tolloid (fruit fly) and BP10 (sea urchin embryo) are involved in processes such as development, tissue differentiation and embryonic hatching [41–45]. In mammals, astacins such as BMP1, tolloid, TLL1 and TLL2 are involved in processes such as extracellular matrix modification and muscular tissue development [46–48]. Additionally, ovastacin and meprins α and β are associated with embryo development, tissue differentiation, cell proliferation and migration, and cell signaling [49–54].

The astacins from *Loxosceles* spiders venoms are believed to be related to the gravitational spreading of dermonecrosis, hemorrhagic disturbances, imperfect platelet adhesion, increased vascular permeability and kidney damage [10,25–28]. In addition, these proteases could possibly act as a spreading factor for other venom toxins and could serve as important agents in the processing of other venom toxins by cleaving inactive proteins and generating active peptides that may be involved in the effects of loxoscelism [9,27,28].

In the present article, we report the cloning, heterologous expression, purification and characterization of a new isoform of *Loxosceles* Astacin-Like Protease (LALP3) from *L. intermedia* venom. As previously reported, after screening a cDNA library of the *L. intermedia* venom gland, sequence analysis revealed that the cDNA sequence of the corresponding mature LALP3 comprises 600 bp. The deduced mature peptide comprises 200 amino acid residues containing the astacin family HEXXHXXGFXHE (enzymatic catalytic domain) and SXMHY (Met-turn) motifs. The calculated molecular mass of mature LALP3 was 23.1 kDa, and the pI was 9.22, as predicted (ProtParam tool from Expasy) [55]. Additionally, two possible N-glycosylation sites were identified for LALP3 [33].

Here, we show by immunoblot assays that LALP3 epitopes are recognized by polyclonal antibodies raised against *L. intermedia* whole venom and LALP1 in a conformation-dependent manner. Moreover, homology modeling and structural analysis of LALP3 revealed that the toxin shares its overall structure identity and highly conserved active site conformation with the *A. astacus* astacin and possibly, similarly to LALP1, represents an active isoform present in *L. intermedia* venom.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

Crude venom from *L. intermedia* was obtained by applying electro-stimulation to the cephalothorax of wild spiders caught in Lapa City, Parana, Brazil (authorized by the Brazilian Institute of Environment and Natural Resources – IBAMA, document number

29801-1), as described by Feitosa *et al* [7]. Polyclonal antibodies that recognize recombinant LALP1 and native *L. intermedia* venom toxins were produced in rabbits as previously described [26,27,56].

2.2. cDNA library construction

The cDNA library of *L. intermedia* venom glands was previously constructed by Chaim *et al* [15]. Shortly, venom gland mRNAs from 200 adult *L. intermedia* spiders were purified using the FastTrack 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cDNAs were then synthesized using the SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen), cloned into NotI and SalI pre-cut pSPORT1 cloning vector and transformed into *Escherichia coli* DH5α cells. The selection of transformants was performed on LB (Luria–Bertani) agar plates containing 100 μg/ml ampicillin.

2.3. cDNA library screening and sub-cloning of mature LALP3 into the pET-SUMO expression vector

cDNA library screening was carried out as described by Trevisan-Silva *et al* [33]. Briefly, randomly chosen colonies (approx. 100 clones) were inoculated into LB broth containing 100 μg/ml ampicillin and were grown overnight at 37 °C. Afterwards, recombinant plasmids were purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The cloned cDNAs were sequenced on both strands using the ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were analyzed using an ABI 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems). The T7 and SP6 promoter regions were used for priming the sequencing reactions. The cDNA sequences were analyzed, and the putative protein products from these sequences were used to search the NCBI GenBank protein databases.

By using the LALP3 precursor cDNA sequence obtained by Trevisan-Silva and colleagues [33] after screening the *L. intermedia* venom gland cDNA library, the sequence encoding the putative mature metalloprotease toxin LALP3 was amplified by PCR using Pfu DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania). The forward primer employed in the reaction was 5′-AACGCTCTCAAGTATGACAG-3′, and the reverse primer was 5′-CCTTTCCTGTTTAAG**ATT**GGC-3′, with the native stop codon of the cDNA present in the latter sequence (in bold). The PCR product was adenylated in a reaction with adenosine nucleotides and Taq DNA Polymerase (Fermentas) and was then gel-purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (General Electric, Fairfield, CT, USA). The purified DNA was sub-cloned into the "TA" expression vector Champion pET-SUMO (Novagen, Madison, WI, USA). The correct construct was confirmed by PCR and sequencing.

2.4. Recombinant protein expression

The recombinant construct was expressed as a fusion protein comprising a 6xHis-tag and a 109-amino acid SUMO (Small Ubiquitin-Related Modifier) solubility tag at the N-terminus, followed by mature LALP3. The expression construct was transformed into *E. coli* BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen) and SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) competent cells, which were then plated onto LB agar plates containing 50 μg/ml kanamycin (USB) and grown at 37 °C and 30 °C, respectively. Single colonies were used to inoculate tryptone-phosphate broth (50 μg/ml kanamycin) and were grown overnight at 37 °C for BL21 cells and at 30 °C for SHuffle cells. These cultures were diluted 1:100 into 1 L of fresh tryptone-phosphate broth using the same conditions as previously stated, until the OD_{600} reached 0.4–0.5. Recombinant expression was induced by the addition of IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA) to a final concentration of 0.5 mM for BL21 cells and 1 mM for SHuffle cells. The cultures were incubated for 4 h at 30 °C with vigorous shaking. Cells were harvested by centrifugation at 4000 × g for 7 min at 4 °C, before being resuspended in 10 ml of a native binding buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl and 10 mM imidazole) and maintained at 4 °C overnight [17,27].

2.5. Protein purification

Cell suspension lysis of BL21 and SHuffle cultures was carried out in a French Press (4 cycles at 1000 psi), and the samples were clarified by centrifugation at 9000 × g for 30 min at 4 °C. The soluble fractions were incubated with Ni-NTA agarose beads (Qiagen) for 1 h at 4 °C with gentle agitation. The samples were loaded onto a column, and the packed gel was exhaustively washed with the following buffer: 50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole. The recombinant protein was then eluted using elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 250 mM imidazole), and 1 ml fractions were collected and resolved by SDS-PAGE (12.5% gels) under reducing conditions (with 5% β-mercaptoethanol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fractions were pooled and submitted to dialysis against 100 mM sodium phosphate buffer (100 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7.4) for 16 h. After dialysis, the recombinant protein was recovered from the supernatant by centrifugation at 9000 × g for 30 min at 4 °C and quantified by using the Coomassie Blue method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [17,27,57].

2.6. Animals

Adult rabbits (average weight: 3 kg) from the Central Animal House of the Federal University of Paraná were used to produce polyclonal antibodies for the recognition of recombinant LALP1 and *L. intermedia* crude venom toxins. All experimental protocols using animals were performed according to the *Principles of Laboratory Animal Care* [NIH (National Institutes of Health) Publication number 85–23, revised 1985] and the Brazilian Federal Laws and Ethical Committee Agreement number 612 of Federal University of Paraná.

2.7. Gel electrophoresis and immunoblotting

Protein analysis was conducted by SDS-PAGE (12.5% gels) performed under reducing conditions (with 5% β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), and proteins were detected by gel staining with Coomassie Blue (Bio-Rad). Molecular-mass markers for SDS-PAGE and immunoblotting assays were purchased from Sigma-Aldrich. Western blotting and dot blotting assays for the recognition of denatured and non-denatured epitopes, respectively, were carried out by the transference/binding of purified LALP3 and *L. intermedia* crude venom toxins to nitrocellulose membranes (General Electric) for 1 h. The membranes were subsequently incubated with a blocking solution (PBS with 3% w/v low fat milk) for 2 h at room temperature. The membranes were immunostained with primary monoclonal antibodies to recognize the 6xHis-tag (General Electric) and with polyclonal hyperimmune antisera and purified IgGs to recognize LALP3 and *L. intermedia* crude venom toxins. The membranes were incubated for 2 h at room temperature and then submitted to washing steps with PBS. The membranes were then incubated with secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature, and the chromogenic reaction was developed using NBT/BCIP (nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3′-indolyphosphate p-toluidine salt) (Promega, Madison, WI, USA) [27,56].

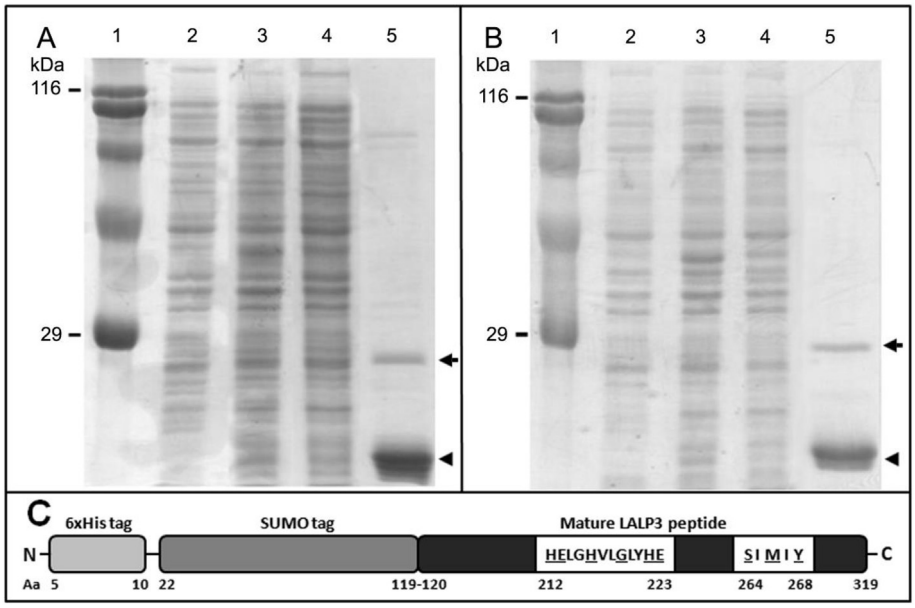


Fig. 1. SDS-PAGE analyses of recombinant LALP3 expression and purification. Analyses were performed in 12,5% gels under reducing conditions stained with Coomassie Blue dye. The toxin expression was performed in *E. coli* SHuffle T7 Express LysY (A) and BL21 STAR (DE3) One Shot (B). Lane 1 shows the molecular marker used as reference. Lanes 2 and 3 depict the *E. coli* cells collected by centrifugation and resuspended in gel loading buffer before and 4 h after induction with 1 mM IPTG (A) and 0.05 mM (B), respectively. Lane 4 depicts the supernatant of cell lysates obtained after culture centrifugation and mechanical lysis in French Press. Lane 5 depicts the eluted LALP3 (arrow) separated from SUMO solubility tag (arrowhead) after purification using Ni-NTA affinity chromatography. Molecular masses are shown on the left. (C) Schematic representation of the recombinant protein LALP3 which comprises a 6-histidine tag between amino acids 5–10 (light gray box); a SUMO solubility tag between amino acids 22–119 (dark gray box); and the mature LALP3 sequence between amino acids 120–319 (black box). The Zinc-Binding Consensus Sequence (amino acids 212–223) and the Met-turn motif (amino acids 264–228) are shown in the white boxes. "N" and "C" represent the amino-terminus and carboxyl-terminus regions of the recombinant protein, respectively.

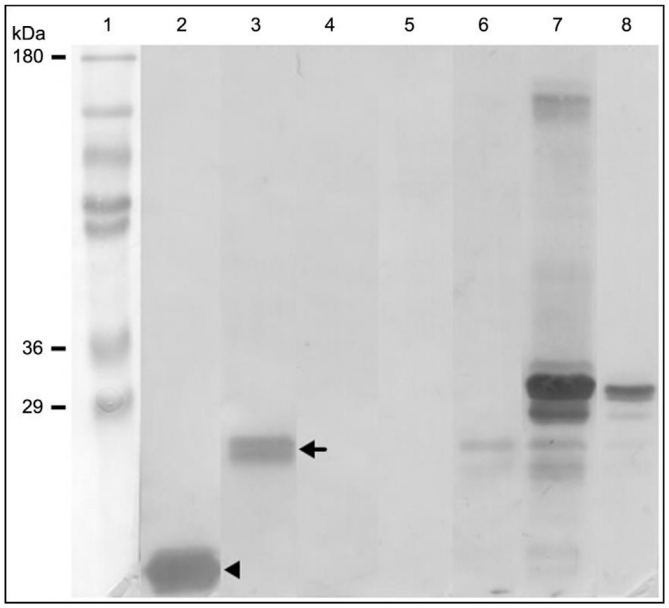


Fig. 2. Western-blot analyses of *L. intermedia* crude venom cross-reactivity with recombinant LALP3. Purified recombinant toxin LALP3 (lanes 2 to 5) and *L. intermedia* crude venom (lanes 6 to 8) at a concentration of 5.0 μg each were resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes. Lane 1 shows the molecular marker used as reference. The SUMO solubility tag (arrowhead) cross-reacted with antibodies that recognize the 6xHis tag, as shown in lane 2. LALP3 (arrow) cross-reacted with polyclonal antisera that recognize LALP1 (lane 3), but did not cross-react with polyclonal antisera and purified IgGs that recognize *L. intermedia* crude venom (lane 4 and 5 respectively). As control, lanes 6, 7 and 8 depict the cross-reactivity of *L. intermedia* crude venom toxins with polyclonal antisera that recognize LALP1, and with polyclonal antisera and purified IgGs that recognize the spider venom, respectively. Molecular-mass markers are shown on the left (sizes in kDa).

2.8. LC-MS/MS analysis

The LC-MS/MS experiments of digested proteins were performed on a Synapt G2 mass spectrometer coupled to a nanoAcquity liquid chromatography system (Waters, Milford, MA, USA). The peptide mixture was loaded in a trap column and desalted online for 5 min at a flow rate of 8 μL/min of phase A (0.1% formic acid) using a Symmetry C18 trapping column (5 μm particles, 180 μm × 20 mm, Waters). The mixture of trapped peptides was subsequently separated by elution with a gradient of 7–35% of phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) through a C18 nanoAcquity BEH 130 capillary column (1.7 μm particles, 75 μm × 150 mm, Waters) in 12 min at a flow rate of 250 nL/min. The data were acquired in the data-dependent mode, and the MS spectra of multiple-charged protonated peptides (+2 to +4) generated by electrospray ionization (ESI) were acquired for 0.5 s from *m*/*z* 300–1600. The three most intense ions exceeding a threshold of 2500 counts were automatically selected and dissociated in MS/MS by 15–60 eV collisions with argon for 0.5 s. The ESI conditions consisted of a capillary voltage of 3.0 kV, a block temperature of 70 °C, and a cone voltage of 50 V. A dynamic peak exclusion window was set to 90 s.

2.9. Data processing and protein identification

The MS raw data was processed in ProteinLynx Global Server 3.0.1 (Waters, Milford, MA, USA) and the resulting pkl files were searched in PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solutions Inc, Waterloo, Canada) against the Araneae database (48696 entries, downloaded on September 21st, 2015 from http://www.uniprot.org) combined with a list of 251 common contaminants. Searches were performed with precursor mass tolerance of 10 ppm, fragment mass tolerances of 0.05 Da, carbamidomethylation of Cys as

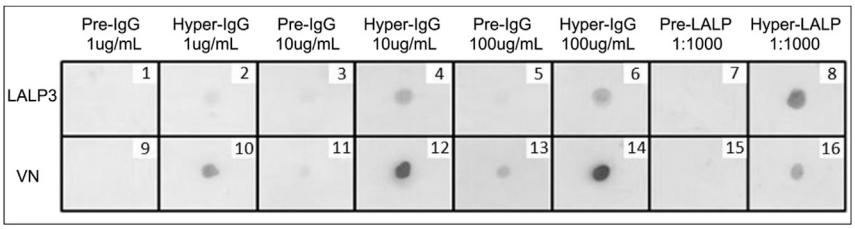


Fig. 3. Dot-blot analyses of *L. intermedia* crude venom cross-reactivity with recombinant LALP3. Purified recombinant toxin LALP3 and *L. intermedia* crude venom at a concentration of 5.0 μg each were blotted onto nitrocellulose membranes and exposed to pre-immune and hyper-immune polyclonal antisera that recognize LALP1 and pre-immune and hyper-immune purified IgGs that recognize *L. intermedia* crude venom. Recombinant LALP3 was shown to cross-react with polyclonal antisera that recognize LALP1 (8) and with purified IgGs that recognize *L. intermedia* venom toxins at concentrations of 1 μg/ml (2), 10 μg/ml (4) and 100 μg/ml (6). As control, *L. intermedia* crude venom was used (9–16).

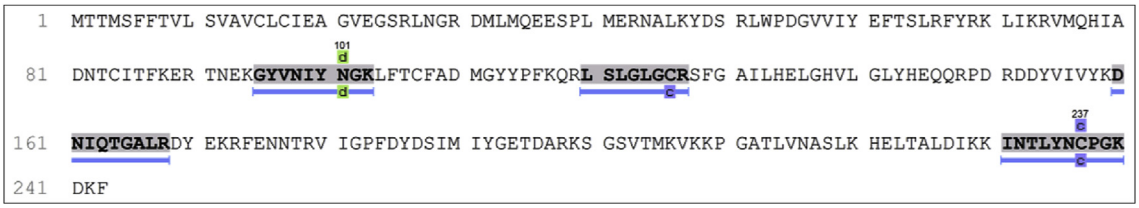


Fig. 4. Sequence of the astacin-like metalloprotease toxin 3 (C9D7R3) **from *L. intermedia***. Blue lines represent peptides identified by mass spectrometry, and "c" and "d" indicate deamidation of N and carbamidomethylation of C, respectively.

fixed modification and oxidation of Met, acetylation of protein N-terminal and deamidation of Asn/Gln as variable modifications. Two missed cleavages were allowed for trypsin, one non-specific cleavage and a maximum of three variable PTMs per peptide. The false discovery rate was estimated by the decoy fusion method [58] and was set at a maximum of 1%.

3. Results

3.1. LALP3 expression and purification

To obtain the recombinant metalloprotease in a soluble state, a construct containing LALP3 adjacent to a 6xHis-tag followed by a

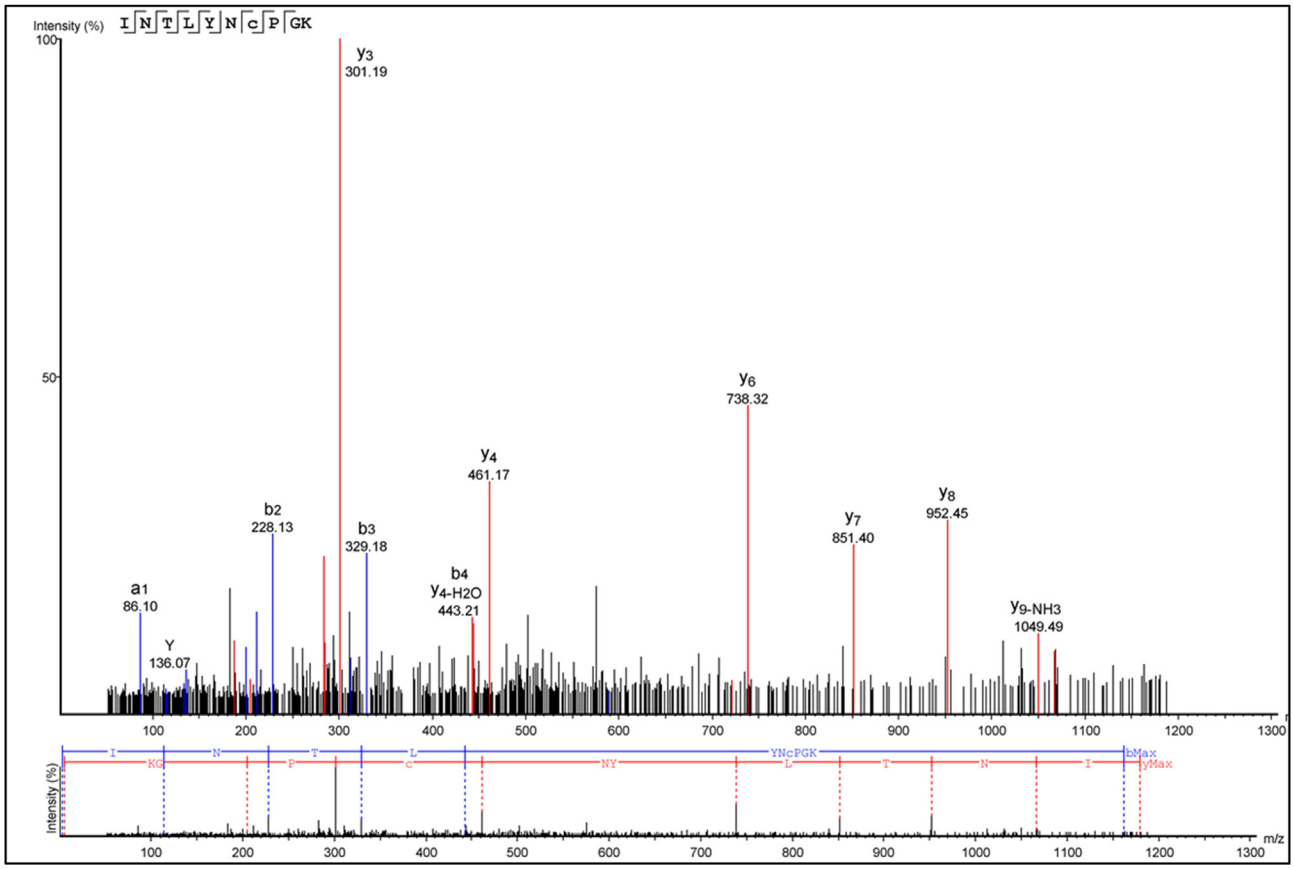


Fig. 5. Annotation of LALP3 MS/MS spectrum. Annotated MS/MS spectrum of the peptide INTLYNCPGK observed at m/z 590.29^{+2}. Ions of the b-series as blue peaks and of the y-series as red.

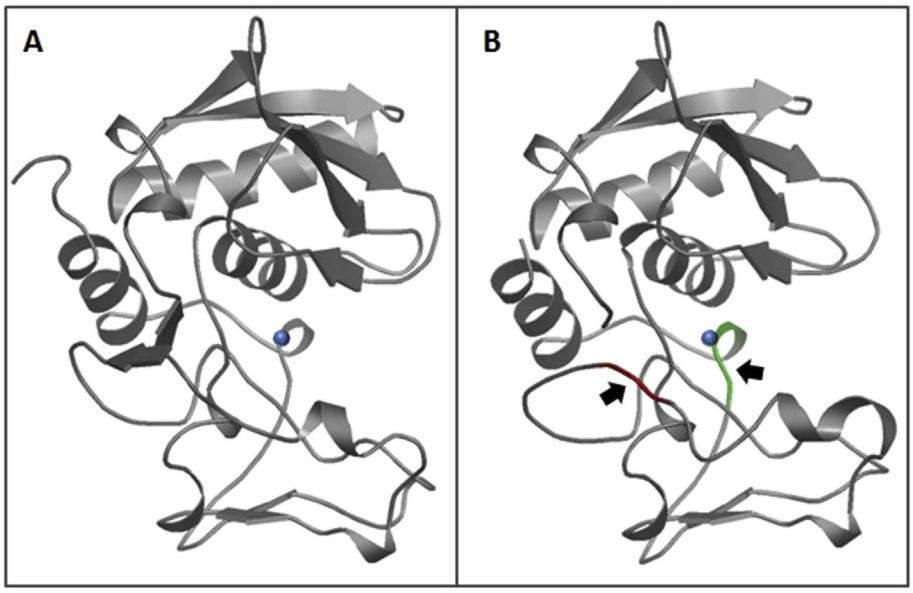


Fig. 6. Three-dimensional structure prediction of LALP3. (A) 1.8 Å resolution structure of the *A. astacus* astacin (PDB:1AST) used as template for the generation of LALP3 model. (B) Structure prediction of LALP3 with the possible kidney-like conformation. The blue sphere represents the zinc ion interacting with the catalytic site of the enzymes. The red and yellow loops depict the two potential N-glycosilation sites of LALP3 (arrows). Structure prediction performed using the Swiss Model tool (http://swissmodel.expasy.org/) and model visualization performed using the Open Astex Viewer tool (http://openastexviewer.net/web/).

SUMO solubility tag was expressed in *E. coli* BL21 STAR (DE3) One Shot and SHuffle T7 Express LysY strains. Protein expression was induced for 4 h with 0.05 mM and 1 mM IPTG, respectively. The SDS-PAGE mobility of LALP3 after protein expression was approximately 36 kDa, comprising the 6xHis-tag fused to the SUMO solubility tag (predicted molecular mass of 14 kDa) and the fusion protein (approximately 24 kDa). The recombinant toxin was then purified by Ni^{2+}-chelating affinity chromatography, and SDS-PAGE analysis revealed two distinct peptides, the first represented by an 18 kDa band and the second by a 24 kDa band, suggesting an autocatalytic activity of recombinant LALP3 (Fig. 1A and B). Despite the possibility of auto-catalysis separating LALP3 from the SUMO solubility tag, the recombinant toxin was soluble, with a final yield of 1–2 mg/L medium after purification.

3.2. Immunological cross-reactivity of recombinant LALP3 and native venom toxins

To evaluate the antigenic cross-reactivity of the purified recombinant toxin with the native venom metalloproteases, western blotting and dot blotting assays were performed. Western blotting analysis revealed that polyclonal antisera against LALP1 cross-reacted with purified recombinant LALP3, whereas monoclonal 6xHis-tag antibodies cross-reacted with the 6xHis tag fused to the SUMO protein. These data suggest that recombinant LALP3 shares similarities to astacin-like metalloproteases from *L. intermedia* venom. Nevertheless, polyclonal antisera and purified IgGs that recognize whole-venom toxins did not cross-react with recombinant LALP3, suggesting that denatured epitopes from the toxin

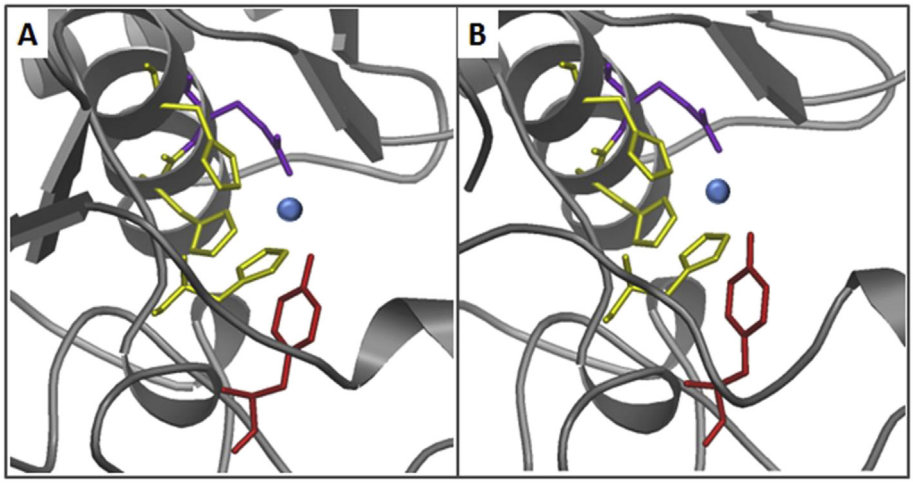
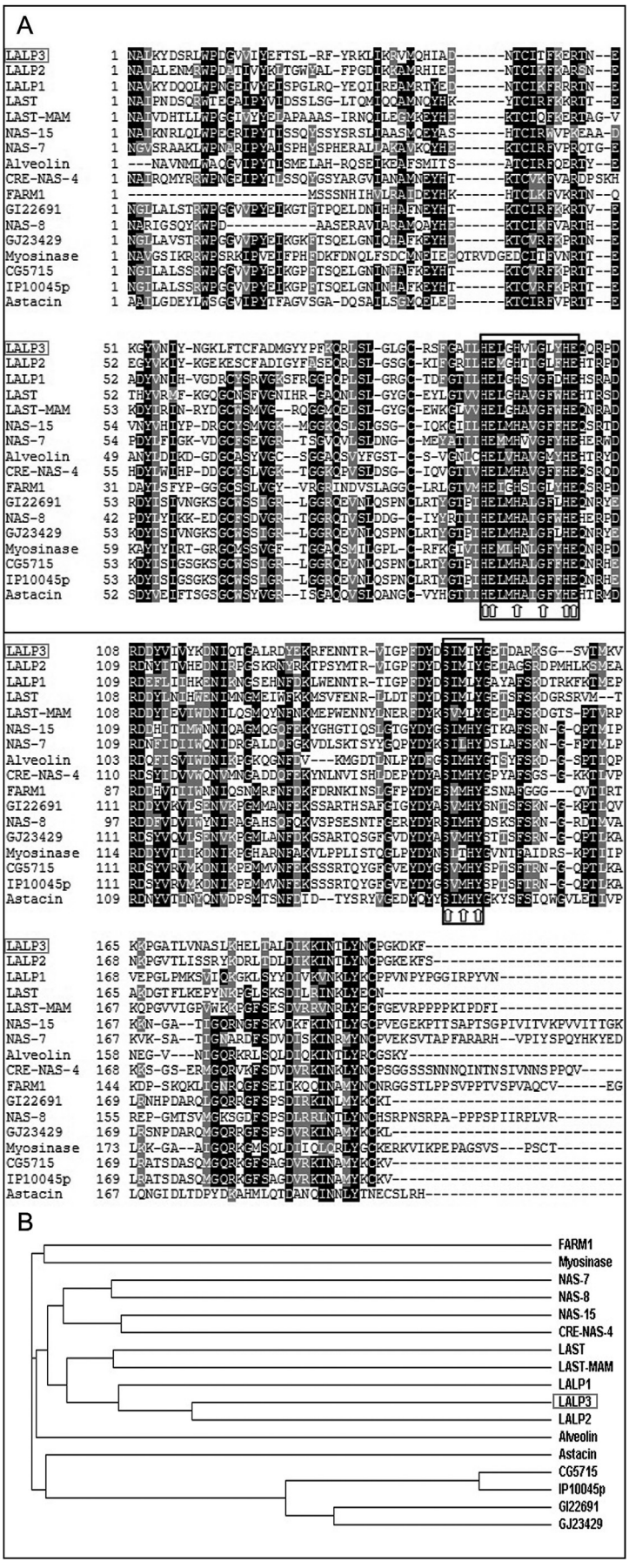


Fig. 7. Three-dimensional structure prediction of LALP3 catalytic site. (A) Structure of *A. astacus* astacin depicting the amino acids that coordinate the zinc ion in the catalytic cleft. The histidines 92, 96 and 102 are represented in yellow. The glutamate 93 is represented in purple. The tyrosine 149 is represented in red. The blue sphere represents the zinc ion. (B) Structure prediction of LALP3 catalytic site, demonstrating a similar amino acid arrangement that interact with the zinc ion, as in astacin. Structure prediction performed using the Swiss Model tool (http://swissmodel.expasy.org/) and model visualization performed using the Open Astex Viewer tool (http://openastexviewer.net/web/).


A
LALP3
LALP2
LALP1
LAST
LAST-MAM
NAS-15
NAS-7
Alveolin
CRE-NAS-4
FARM1
GI22691
NAS-8
GJ23429
Myosinase
CG5715
IP10045p
Astacin
B
FARM1
Myosinase
NAS-7
NAS-8
NAS-15
CRE-NAS-4
LAST
LAST-MAM
LALP1
LALP3
LALP2
Alveolin
Astacin
CG5715
IP10045p
GI22691
GJ23429

were not recognized by these antibodies (Fig. 2). Dot blotting analysis, on the other hand, revealed that not only the polyclonal antisera that recognize LALP1 cross-reacted with purified recombinant LALP3 but also the antisera and purified IgGs that recognize whole-venom toxins recognized non-denatured epitopes from recombinant LALP3 (Fig. 3).

3.3. Identification of LALP3 by LC-MS/MS analysis

Database search of MS/MS spectra acquired from digested peptides resulted in the identification of the astacin-like metalloprotease toxin 3 from *L. intermedia* (C9D7R3)[2]. The toxin was identified with 4 peptides and coverage of 15% (Fig. 4). The peptide INTLYNCPGK, detected at m/z 590.29^{+2}, presented the majority of y-series ion fragments. Taken together, western-blotting, dot blotting, and mass spectrometry data confirmed that LALP3 was a new metalloprotease isoform present in *L. intermedia* venom (Fig. 5).

3.4. Homology modeling and structural analysis of LALP3

For the structural evaluation of LALP3, a three-dimensional prediction was performed. The modeling was carried out on the online Swiss Model software [59–61] using the 1.8 Å X-ray crystal structure of *A. astacus* astacin, available in the Protein Data Bank (PDB:1AST). The LALP3 structure shared 30.8% identity with the prototype astacin, and the modeling depicted the possible kidney-like conformation of the mature toxin, presenting two domains separated by the catalytic cleft, with secondary structures such as alpha helices and beta sheets (Fig. 6). As the catalytic cleft is conserved among the astacin family of metalloproteases, the prediction allowed for the visualization of the possible LALP3 active site conformation, as well as the amino acid residues that interact and coordinate the zinc ion, which is mandatory for the activity of the enzyme (Fig. 7).

3.5. Multiple sequence alignment analysis of the cDNA-deduced amino acid sequences of LALP3 and other astacin family members

To verify that amino acid residues are conserved among LALP3 and other astacin family members, BLAST protein analysis was performed using the GenBank database. Sequence alignment results demonstrated that LALP3 is homologous to other astacin isoforms from *L. intermedia* venom (Fig. 8). The homology was identified by multiple sequence alignment of the LALP3 precursor toxin, which showed 50% and 47% overall identity with the LALP2 (ACV52010.1) and LALP1 (A0FKN6.1) precursor toxins, respectively. Considering other astacin-like proteins from other species, the LALP3 precursor toxin was shown to be more homologous to the astacin-like proteins from the horseshoe crab *Limulus polyphemus* LAST (CAQ16892.1) and LAST-MAM (CAQ16893.1), with 40% overall identity with each, and from the nematode *Caenorhabditis elegans* NAS-15 protein (CAD99210.1), with 39% overall identity (Table 1).

4. Discussion

In the complex mixture of toxins comprising *Loxosceles* genus spiders venoms, the presence of toxins with proteolytic activity was reported using electrostimulated venom [7,22]. The evidence of metalloproteases as components of brown spider venom was determined by the inhibitory effects of bivalent metal chelators such as EDTA and 1,10-phenantroline [8,22,25]. Further studies using venom gland extracts supported the hypothesis that these metalloproteases are toxins from the venom because they showed proteolytic activity and sensitivity to metal chelators. This finding eliminated criticism over the possible contamination of electrostimulated venom with spider stomach egesta, which could possibly contain hydrolytic enzymes, during extraction [8]. Furthermore, a cDNA library of *L. intermedia* venom glands allowed for the identification, cloning, heterologous expression and activity evaluation of LALP1, an astacin-like protease from the venom. Remarkably, this toxin was the first astacin family member to be identified in animal venoms [27]. The astacin family of metalloproteases, named after the prototypical digestive protease astacin from the crayfish *Astacus astacus*, comprises zinc-dependent peptidases [62,63]. These are secreted or membrane-bound, structurally related enzymes characterized by the Zinc-Binding Consensus Sequence (HEXXHXXGXXHE) and the Met-turn motif (SXMHY), both of which are key elements of these enzymes [62,64]. Astacins are rather highly conserved throughout evolution and have been identified in various species such as humans, mice, rats, amphibians, fish, sea urchins, insects, mollusks and bacteria, suggesting their biological relevance [64,65].

We hereby describe the cloning, heterologous expression, purification, immunological cross-reactivity and mass spectrometry identification of a new isoform of Loxosceles Astacin-Like Protease (LALP3) from *L. intermedia* venom. The putative LALP3 amino acid sequence shows that the enzyme comprises a catalytic domain similar to that of LALP1 and other astacin metalloproteases, sharing structural aspects such as the Zinc-Binding Consensus Sequence (HEXXHXXGXXHE) and the Met-turn motif (SXMHY) [27,62,64]. Moreover, LALP3 shares conformational epitopes similar to those of LALP1 and native metalloproteases from *L. intermedia* venom, strengthening the hypothesis that LALP3 is a new brown spider venom toxin.

The high expression of heterologous proteins using prokaryotic cells usually results in insoluble aggregates termed inclusion bodies [66]. The conversion of these misfolded proteins to a soluble and active state depends, in most cases, on the application of refolding techniques [67]. Studies with recombinant astacin metalloproteases have demonstrated a tendency of this group of enzymes to aggregate and form inclusion bodies after expression using prokaryotic cells. The astacin from *A. astacus* was expressed in *E. coli* cells; however, aggregation and inclusion bodies formation was observed, demanding the application of refolding techniques to achieve enzyme solubility and activity [68]. Similarly, other authors employed refolding steps prior to the acquisition of the soluble and active recombinant human ovastacin in a prokaryotic system, because the protein presented high levels of aggregation and inclusion bodies formation [52]. A study regarding astacin-like

Fig. 8. Multiple alignment analysis and phylogenetic relationship of LALP3 cDNA-deduced amino acid sequence with sequences of other astacin family members. Sequences were aligned using the CLUSTAL OMEGA tool (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). (A) Multiple alignment analysis of the amino acid identities among astacin-like metalloproteases. Identical amino acids are shaded in black and conservative substitutions in gray. Arrows in the box point to the astacin consensus sequences (Zinc-Binding Motif and Met-turn). (B) Phylogenetic relationship of LALP3 with other astacin-like metalloproteases based on sequence data from GenBank. The three was constructed with CLUSTAL OMEGA tool. Proteins compared (and their following GenBank numbers) are as follows: LALP2 (ACV52010.1), LALP1 (A0FKN6.1), LAST (CAQ16892.1), LAST-MAM (CAQ16893.1), NAS-15 (CAD99210.1), NAS-7 (CAD99206.1), Alveolin precursor (NP_001098139.1), CRE-NAS-4 (XP_003111864.1), FARM1 (AAF24991.1), GI22691 (XP_002000139.1), NAS-8 (XP_003379499.1), GJ23429 (XP_002053294.1), Myosinase II (BAC16239.1), CG5715 (NP_651242.1), IP10045p (ABF85735.1), Astacin (CAA64981.1).

Table 1
cDNA-deduced amino acid sequence identity among astacin family members.

Protein	LALP3 similarity	Organism	Accession
LALP2	50%	*L. intermedia*	ACV52010.1
LALP1	47%	*L. intermedia*	A0FKN6.1
LAST	40%	*Limulus polyphemus*	CAQ16892.1
LAST-MAM	40%	*Limulus polyphemus*	CAQ16893.1
NAS-15	39%	*Caenorhabditis elegans*	CAD99210.1
NAS-7	36%	*Caenorhabditis elegans*	CAD99206.1
Alveolin precursor	36%	*Oryzias latipes*	NP_001098139.1
CRE-NAS-4	36%	*Caenorhabditis remanei*	XP_003111864.1
FARM1	36%	*Hydra vulgaris*	AAF24991.1
GI22691	36%	*Drosophila mojavensis*	XP_002000139.1
NAS-8	35%	*Trichinella spiralis*	XP_003379499.1
GJ23429	35%	*Drosophila virilis*	XP_002053294.1
Myosiniase II	35%	*Todarodes pacificus*	BAC16239.1
CG5715	35%	*Drosophila melanogaster*	NP_651242.1
IP10045p	35%	*Drosophila melanogaster*	ABF85735.1
Astacin	32%	*Astacus astacus*	CAA64981.1

metalloproteases from *L. intermedia* venom, also demonstrated solubility issues when working with LALP1 [27]. After the employment of refolding steps, the enzyme was obtained in a soluble, active condition.

As an alternative to the application of refolding techniques, solubility tags fused to the protein of interest have been extensively used to increase the levels of solubility of heterologous proteins. It has been shown that solubility tags, when positioned at the N-terminus of the recombinant protein, help to protect it from proteolysis caused by bacterial proteases [69], increase expression levels [70] and promote the correct folding, resulting in the production of soluble recombinant protein [71–73]. Following this approach, cDNA corresponding to the mature LALP3 was cloned into the pET-SUMO vector, which allows for the attachment of a SUMO solubility tag to the N-terminus of the recombinant protein. Previous reports from other authors demonstrated that this tag has been successful in promoting the solubility and correct folding of proteins that were once insoluble [72–76].

Heterologous expression of LALP3 using *E. coli* SHuffle T7 Express LysY and BL21 STAR (DE3) One Shot strains resulted in similar levels of the toxin in a soluble state. Samples from the cultures were submitted to Ni-NTA Agarose affinity chromatography, and, using this approach, recombinant LALP3 was eluted in a pure form, as determined by SDS-PAGE. Nevertheless, the presence of an 18-kDa band in the purified sample indicated that the SUMO solubility tag was possibly separated from LALP3, with an approximately 24-kDa band. To explain the separation of the tag from the recombinant toxin, the possibility of LALP3 autocatalysis was considered. Because astacin metalloproteases are endopeptidases [64], these proteases are likely to undergo autocatalysis, as observed in the activation process for these enzymes, in which the pro-peptide is hydrolyzed by the active site of astacins [39]. In a similar fashion, LALP3 could possibly hydrolyze the SUMO tag as part of an activation process.

To further investigate the relationship between LALP3 and metalloproteases from brown spider venom, immunoblotting assays using antibodies that cross-react with *L. intermedia* whole-venom metalloproteases and LALP1 were carried out. The data obtained revealed that these antibodies cross-react with the purified 24-kDa protein corresponding to LALP3. Western-blotting analyses performed with polyclonal antisera raised against recombinant LALP1 revealed high cross-reactivity with LALP3 (Fig. 2). However, polyclonal antisera and purified immunoglobulins raised against *L. intermedia* whole-venom toxins did not show cross-reactivity with the recombinant toxin through western blotting assays (Fig. 2). On the other hand, dot blotting assays demonstrated that polyclonal antisera against LALP1, polyclonal antisera and purified immunoglobulins that recognize *L. intermedia* whole-venom toxins cross-reacted with the recombinant protein (Fig. 3), indicating that LALP3 exhibits conformational epitopes that are recognized by these antibodies, and suggesting that the toxin is a metalloprotease from the spider venom. Further data obtained from mass spectrometry revealed that, after analysis, 4 peptides from the purified toxin match the annotated astacin-like metalloprotease toxin 3 (C9D7R3) putative amino acid sequence (Fig. 4). Therefore, the immunoblotting assays along with mass spectrometry analysis support the hypothesis that LALP3 represents a new isoform of astacin-like metalloprotease present in *L. intermedia* venom.

In a previous study, our group characterized the relationship between LALP1 and *L. intermedia* crude venom toxins by performing immunoassays with polyclonal antisera that recognize the recombinant toxin and venom toxins, strengthening the evidence that LALP1 is present in the spider venom [27]. Moreover, the relationship between LALP1 and native venom toxins from other *Loxosceles* genus spiders was investigated. By using polyclonal antisera that recognize LALP1 or the whole-venom of different *Loxosceles* species, LALP1 was shown to present linear and conformational epitopes that cross-react with native venom toxins from *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia*, suggesting that astacin-like metalloproteases, as a gene family, are present in the venom of different *Loxosceles* species [33,77].

Evidence that LALP3 is likely an astacin-like metalloprotease from *L. intermedia* venom has already been reported. Signatures of astacin metalloproteases such as the Zinc-Binding Consensus Sequence (HEXXHXXGXXHE) and the Met-turn motif (SXMHY) were shown to be conserved in LALP3. Additional analyses of the predicted amino acid sequences of LALPs from *L. intermedia* venom revealed that LALP3 shares 46% identity with LALP1 and 43% identity with LALP2. Moreover, LALP3 is also similar to other putative astacin-like proteases from different brown spiders species, showing 48% identity with LALP4 from *L. laeta* and 40% identity with LALP5 from *L. gaucho* [33]. Transcriptome analysis of the *L. intermedia* venom gland supported the hypothesis that astacin-like metalloprotease isoforms are present in the venom. The study demonstrated that approximately 22% of the toxin-encoding transcripts represent members of the astacin family; from these, transcripts encoding LALP1, LALP2 and LALP3 were identified, as were additional transcripts that possibly encode at least two new isoforms [30]. Strengthening the hypothesis that isoforms of these proteases are present in the venom, two proteomic analyses identified the presence of several possible isoforms of astacin-like

metalloproteases in *Loxosceles* spiders venoms. Using a shotgun approach coupled with mass spectrometry, at least two zinc metalloprotease sequences were reported as possible *L. intermedia* toxins [78], whereas 2DE immunoblotting and gelatin zymography showed that astacin-like metalloproteases represent a family of toxins present in *L. laeta, L. gaucho* and *L. intermedia* venoms [32].

In a complementary approach, the homology modeling and structural analysis of LALP3 corroborated with previous data related to the putative amino acid sequences. Three-dimensional structural prediction of LALP3 was performed to identify similarities shared by the toxin and other members from the astacin family of metalloproteases. The prediction was made using the structure of the prototypical astacin from *A. astacus* (PDB:1AST) as a model. Data obtained from the modeling allowed for the observation of the possible kidney-like conformation of LALP3 (Fig. 6), similar to that of astacin demonstrated by X-ray crystallography [79]. The amino acid residues responsible for coordinating the zinc ion in the catalytic cleft of astacin metalloproteases (histidines 92, 96 and 102, glutamate 103 and tyrosine 149) are conserved among members of this family [79,80]. The structural prediction of LALP3 allowed for the visualization of these amino acid residues positioned in the same fashion as in astacin (Fig. 7). Despite the 30% identity shared by LALP3 and astacin, structural analyses of the highly conserved motifs that compose the catalytic site strengthened the hypothesis that this protease is an astacin-like metalloprotease isoform from *L. intermedia* venom.

The identification of a new Loxosceles Astacin-Like Metalloprotease isoform from *L. intermedia* venom suggests that this group of toxins are conserved and biologically representative molecules in the spider venom, because they constitute a gene family present in several *Loxosceles* species [32,33]. However, the biological functions of these metalloproteases remain under investigation. Astacin-like proteases from spiders venoms are believed to play a role as digestive enzymes to degrade molecules of prey, which, in turn, could be carried away as food [27,33]. In support of this hypothesis, an astacin-like protease present in the digestive fluid of the spider *Argiope aurantia* was identified [81], which strengthens the idea of astacin-like proteases as components of some spiders venoms with digestive functions. In agreement with this, the astacin from *Astacus astacus*, the prototype of the family, is a digestive enzyme found in the gastric fluid of the animal [82]. Based on homology data obtained from sequence alignments with the astacin from *A. astacus* and recombinant LALP1 from *L. intermedia*, it is possible to postulate that LALP3 might play a role as a digestive protease in the spider feeding process. Moreover, three-dimensional structure analysis revealed that LALP3 shares structural aspects with astacin, especially considering the catalytic site, which is conserved in the astacin family [36].

Another putative function attributed to LALPs is the ability to degrade extracellular matrix molecules. It is known that metalloproteases from *L. intermedia* crude venom are able to hydrolyze fibrinogen and fibronectin [7,23,27]. Fibrinogen plays a role in processes such as blood clotting, cellular and matrix interactions, inflammatory responses and wound healing [83]. Fibronectin is a multifunctional multidomain protein with manifold functions in cell adhesion, cell migration, cell differentiation, platelet aggregation, blood vessel stability and wound healing [84]. In turn, it has been postulated that the action of metalloproteases from the venom upon fibrinogen and fibronectin molecules could be involved in the local hemorrhage that has been described in the dermis of victims bitten by brown spiders via imperfect platelet adhesion and impaired would healing [33]. Still, *L. intermedia* venom metalloproteases hydrolyze entactin and the protein core of heparan sulfate. These molecules are important components of basement membranes, which are specialized extracellular matrices that play a role in blood vessel stability and platelet adhesion [22–24,85]. Again, it has been suggested that metalloproteases from brown spiders venoms are likely involved in the hemorrhage and increased vascular permeability that afflict spider-bite victims [33]. Furthermore, because these metalloproteases degrade extracellular matrix components, it is believed that these enzymes could act as spreading factors for other venom toxins. Additionally, these proteases could cleave inactive proteins and generate active peptides that might be involved in the effects caused by envenomation from brown spiders [27,33].

In conclusion, we have cloned, heterologously expressed and purified the mature peptide of a new Loxosceles Astacin-Like Protease isoform, LALP3, from *L. intermedia* venom. We have also demonstrated the immunological cross-reactivity of LALP3 with LALP1 and *L. intermedia* crude venom, showing that conformational epitopes are recognized by purified IgGs raised against the crude spider venom. Moreover, immunoblotting assays and mass spectrometry data confirmed that LALP3 is a new isoform of astacin-like metalloprotease present in *L. intermedia* venom. Additionally, three-dimensional structural prediction of LALP3 demonstrated that the enzyme shares structural aspects with the astacin from *A. astacus*, and homology data obtained from multiple sequence alignment revealed the presence of highly conserved motifs that are shared with other astacin-like proteases. These results bring about the possibility of developing further studies regarding metalloproteases from brown spiders venoms. In turn, these studies could provide new insights into loxoscelism and further allow the application of these proteases as biotechnological tools. The novel Loxosceles Astacin-Like Protease isoform from *L. intermedia* venom could namely be used as a biotool in pharmaceutical and medical research protocols or in studies regarding ECM remodeling and assembly. In addition, LALP3 could possibly be used in drug delivery as a co-adjuvant, as a starting model for the design of new drugs/molecules such as agonists or inhibitors, and even as a therapeutic pharmaceutical such as a thrombolytic agent [28,86].

Data

The GenBank data deposition information for the LALP3 protein is ACV52011.1

The Uniprot data deposition information for the LALP3 protein is C9D7R3.

Author contributions

Morgon, A. M., Belisario-Ferrari, M. R., Marin, B. designed and executed the experiments; Morgon, A. M. and Belisario-Ferrari, M. R. performed the three-dimensional structure predictions; Morgon, A. M., Trevisan-Silva, D., Meissner, G. O., Vuitika, L. analyzed the data; Tashima, A. K., performed the mass spectrometry analysis; Morgon, A. M., Chaim, O. M. wrote the paper; Gremski, L. H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S. S., Chaim, O. M. contributed with advisory and scientific knowledge.

Conflicts of interests

Herein, we effort that all authors assure that there is no kind of conflicts of interest regarding to this manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CAPES, CNPq, SETI-PR, FAPESP (Proc. 2012/19321-9) and Fundação Araucária, Paraná, Brazil. We are grateful to Rafael Zotz (Zoo Technician at Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil) for his help with the

immunization procedures for the production of the *anti*-LALP1 sera used in the immunoassays.

References

[1] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M.H. Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism, Toxicon 44 (2004) 693–709.
[2] J.M. Futrell, Loxoscelism, Am. J. Med. Sci. 304 (1992) 261–267.
[3] J.M. Lung, S.B. Mallory, A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge, Int. J. Dermatol 39 (2000) 287–289.
[4] C.M. Malaque, M.L. Santoro, J.L. Cardoso, M.R. Conde, C.T. Novaes, J.Y. Risk, F.O. Franca, C.R. de Medeiros, H.W. Fan, Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism, Toxicon 58 (2011) 664–671.
[5] U.M. Sezerino, M. Zannin, L.K. Coelho, J. Goncalves Junior, M. Grando, S.G. Mattosinho, J.L. Cardoso, V.R. von Eickstedt, F.O. Franca, K.C. Barbaro, H.W. Fan, A clinical and epidemiological study of Loxosceles spider envenoming in Santa Catarina, Brazil, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92 (1998) 546–548.
[6] M.H. Appel, R.B. da Silveira, W. Gremski, S.S. Veiga, Insights into brown spider and loxoscelism, Invertabrate Surviv. J. 2 (2005) 152–158.
[7] L. Feitosa, W. Gremski, S.S. Veiga, M.C. Elias, E. Graner, O.C. Mangili, R.R. Brentani, Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, Toxicon 36 (1998) 1039–1051.
[8] R.B. da Silveira, J.F. dos Santos Filho, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, H.B. Nader, C.P. von Dietrich, Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders, Toxicon 40 (2002) 815–822.
[9] L.H. Gremski, D. Trevisan-Silva, V.P. Ferrer, F.H. Matsubara, G.O. Meissner, A.C. Wille, L. Vuitika, C. Dias-Lopes, A. Ullah, F.R. de Moraes, C. Chavez-Olortegui, K.C. Barbaro, M.T. Murakami, R.K. Arni, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins, Toxicon 83 (2014) 91–120.
[10] K.C. Barbaro, I. Knysak, R. Martins, C. Hogan, K. Winkel, Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five Loxosceles spider venoms of medical importance in the Americas, Toxicon 45 (2005) 489–499.
[11] R.B. da Silveira, O.M. Chaim, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Hyaluronidases in Loxosceles intermedia (brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases, Toxicon 49 (2007) 758–768.
[12] V.P. Ferrer, T.L. de Mari, L.H. Gremski, D. Trevisan Silva, R.B. da Silveira, W. Gremski, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, H.B. Nader, S.S. Veiga, A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's hyaluronidase): from cloning to functional characterization, PLoS Negl. Trop. Dis. 7 (2013) e2206.
[13] A.R. Young, S.J. Pincus, Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*, Toxicon 39 (2001) 391–400.
[14] M.H. Appel, R.B. da Silveira, O.M. Chaim, K.S. Paludo, D.T. Silva, D.M. Chaves, P.H. da Silva, O.C. Mangili, A. Senff-Ribeiro, W. Gremski, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, Biochim. Biophys. Acta 1780 (2008) 167–178.
[15] O.M. Chaim, Y.B. Sade, R.B. da Silveira, L. Toma, E. Kalapothakis, C. Chavez-Olortegui, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. von Dietrich, H.B. Nader, S. Sanches Veiga, Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity, Toxicol. Appl. Pharmacol. 211 (2006) 64–77.
[16] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, J.L. Dreyfuss, L. Toma, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, W. Gremski, Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization, Biochimie 89 (2007) 289–300.
[17] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, J.L. Dreyfuss, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom gland, Biochimie 88 (2006) 1241–1253.
[18] S.A. de Andrade, M.F. Pedrosa, R.M. de Andrade, M.L. Oliva, C.W. van den Berg, D.V. Tambourgi, Conformational changes of Loxosceles venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism, Biochem. Biophys. Res. Commun. 327 (2005) 117–123.
[19] S.S. Veiga, R.B. da Silveira, J.L. Dreyfus, J. Haoach, A.M. Pereira, O.C. Mangili, W. Gremski, Identification of high molecular weight serine-proteases in Loxosceles intermedia (brown spider) venom, Toxicon 38 (2000) 825–839.
[20] C.S. de Castro, F.G. Silvestre, S.C. Araujo, M.Y. Gabriel de, O.C. Mangili, I. Cruz, C. Chavez-Olortegui, E. Kalapothakis, Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*, Toxicon 44 (2004) 273–280.
[21] F.H. Matsubara, L.H. Gremski, G.O. Meissner, E.S. Constantino Lopes, W. Gremski, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches, Toxicon 71 (2013) 147–158.
[22] S.S. Veiga, L. Feitosa, V.L. dos Santos, G.A. de Souza, A.S. Ribeiro, O.C. Mangili, M.A. Porcionatto, H.B. Nader, C.P. Dietrich, R.R. Brentani, W. Gremski, Effect of brown spider venom on basement membrane structures, Histochem J. 32 (2000) 397–408.
[23] S.S. Veiga, V.C. Zanetti, A. Braz, O.C. Mangili, W. Gremski, Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins, Braz J. Med. Biol. Res. 34 (2001) 843–850.
[24] S.S. Veiga, V.C. Zanetti, C.R. Franco, E.S. Trindade, M.A. Porcionatto, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells, Thromb. Res. 102 (2001) 229–237.
[25] V.C. Zanetti, R.B. da Silveira, J.L. Dreyfuss, J. Haoach, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom, Blood Coagul. Fibrinolysis 13 (2002) 135–148.
[26] M.N. Luciano, P.H. da Silva, O.M. Chaim, V.L. dos Santos, C.R. Franco, M.F. Soares, S.M. Zanata, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Experimental evidence for a direct cytotoxicity of Loxosceles intermedia (brown spider) venom in renal tissue, J. Histochem Cytochem 52 (2004) 455–467.
[27] R.B. da Silveira, A.C. Wille, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, C.R. Franco, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom, Biochem. J. 406 (2007) 355–363.
[28] O.M. Chaim, D. Trevisan-Silva, D. Chaves-Moreira, A.C. Wille, V.P. Ferrer, F.H. Matsubara, O.C. Mangili, R.B. da Silveira, L.H. Gremski, W. Gremski, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, Brown spider (Loxosceles genus) venom toxins: tools for biological purposes, Toxins (Basel) 3 (2011) 309–344.
[29] G. Corzo, N. Gilles, H. Satake, E. Villegas, L. Dai, T. Nakajima, J. Haupt, Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider Macrothele gigas that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel, FEBS Lett. 547 (2003) 43–50.
[30] L.H. Gremski, R.B. da Silveira, O.M. Chaim, C.M. Probst, V.P. Ferrer, J. Nowatzki, H.C. Weinschutz, H.M. Madeira, W. Gremski, H.B. Nader, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis, Mol. Biosyst. 6 (2010) 2403–2416.
[31] Y.B. Sade, M. Boia-Ferreira, L.H. Gremski, R.B. da Silveira, W. Gremski, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from Loxosceles intermedia (brown spider) venom, Int. J. Biochem. Cell Biol. 44 (2012) 170–177.
[32] D. Trevisan-Silva, A.V. Bednaski, L.H. Gremski, O.M. Chaim, S.S. Veiga, A. Senff-Ribeiro, Differential metalloprotease content and activity of three Loxosceles spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches, Toxicon 76 (2013) 11–22.
[33] D. Trevisan-Silva, L.H. Gremski, O.M. Chaim, R.B. da Silveira, G.O. Meissner, O.C. Mangili, K.C. Barbaro, W. Gremski, S.S. Veiga, A. Senff-Ribeiro, Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus Loxosceles), Biochimie 92 (2010) 21–32.
[34] P.A. Zobel-Thropp, S.M. Correa, J.E. Garb, G.J. Binford, Spit and venom from scytodes spiders: a diverse and distinct cocktail, J. Proteome Res. 13 (2014) 817–835.
[35] P.A. Zobel-Thropp, E.Z. Thomas, C.L. David, L.A. Breci, G.J. Binford, Plectreurys tristis venome: a proteomic and transcriptomic analysis, J. Venom. Res. 5 (2014) 33–47.
[36] F.X. Gomis-Ruth, S. Trillo-Muyo, W. Stocker, Functional and structural insights into astacin metallopeptidases, Biol. Chem. 393 (2012) 1027–1041.
[37] W. Stocker, R.L. Wolz, R. Zwilling, D.J. Strydom, D.S. Auld, Astacus protease, a zinc metalloenzyme, Biochemistry 27 (1988) 5026–5032.
[38] W. Bode, F.X. Gomis-Ruth, R. Huber, R. Zwilling, W. Stocker, Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases, Nature 358 (1992) 164–167.
[39] T. Guevara, I. Yiallouros, R. Kappelhoff, S. Bissdorf, W. Stocker, F.X. Gomis-Ruth, Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase, J. Biol. Chem. 285 (2010) 13958–13965.
[40] I. Yiallouros, R. Kappelhoff, O. Schilling, F. Wegmann, M.W. Helms, A. Auge, G. Brachtendorf, E.G. Berkhoff, B. Beermann, H.J. Hinz, S. Konig, J. Peter-Katalinic, W. Stocker, Activation mechanism of pro-astacin: role of the propeptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing, J. Mol. Biol. 324 (2002) 237–246.
[41] T. Lepage, C. Ghiglione, C. Gache, Spatial and temporal expression pattern during sea urchin embryogenesis of a gene coding for a protease homologous to the human protein BMP-1 and to the product of the Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid, Development 114 (1992) 147–163.
[42] S.D. Reynolds, L.M. Angerer, J. Palis, A. Nasir, R.C. Angerer, Early mRNAs, spatially restricted along the animal-vegetal axis of sea urchin embryos, include one encoding a protein related to tolloid and BMP-1, Development 114 (1992) 769–786.
[43] S.M. Sato, T.D. Sargent, Molecular approach to dorsoanterior development in Xenopus laevis, Dev. Biol. 137 (1990) 135–141.
[44] M.J. Shimell, E.L. Ferguson, S.R. Childs, M.B. O'Connor, The Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1, Cell 67 (1991) 469–481.

[45] S. Yasumasu, K. Yamada, K. Akasaka, K. Mitsunaga, I. Iuchi, H. Shimada, K. Yamagami, Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of Oryzias latipes, and concurrent expression of their mRNAs during development, Dev. Biol. 153 (1992) 250–258.
[46] D.R. Hopkins, S. Keles, D.S. Greenspan, The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases, Matrix Biol. 26 (2007) 508–523.
[47] E. Kessler, K. Takahara, L. Biniaminov, M. Brusel, D.S. Greenspan, Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase, Science 271 (1996) 360–362.
[48] S.W. Li, A.L. Sieron, A. Fertala, Y. Hojima, W.V. Arnold, D.J. Prockop, The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996) 5127–5130.
[49] T. Jefferson, M. Causevic, U. auf dem Keller, O. Schilling, S. Isbert, R. Geyer, W. Maier, S. Tschickardt, T. Jumpertz, S. Weggen, J.S. Bond, C.M. Overall, C.U. Pietrzik, C. Becker-Pauly, Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo, J. Biol. Chem. 286 (2011) 27741–27750.
[50] Y.J. Li, Y.H. Fan, J. Tang, J.B. Li, C.H. Yu, Meprin-beta regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages, Int. Immunopharmacol. 18 (2014) 77–84.
[51] E.S. Pires, C. Hlavin, E. Macnamara, K. Ishola-Gbenla, C. Doerwaldt, C. Chamberlain, K. Klotz, A.K. Herr, A. Khole, O. Chertihin, E. Curnow, S.H. Feldman, A. Mandal, J. Shetty, C. Flickinger, J.C. Herr, SAS1B protein [ovastacin] shows temporal and spatial restriction to oocytes in several eutherian orders and initiates translation at the primary to secondary follicle transition, Dev. Dyn. 242 (2013) 1405–1426.
[52] V. Quesada, L.M. Sanchez, J. Alvarez, C. Lopez-Otin, Identification and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish, J. Biol. Chem. 279 (2004) 26627–26634.
[53] A. Schutte, J. Hedrich, W. Stocker, C. Becker-Pauly, Let it flow: morpholino knockdown in zebrafish embryos reveals a pro-angiogenic effect of the metalloprotease meprin alpha2, PLoS One 5 (2010) e8835.
[54] E.E. Sterchi, W. Stocker, J.S. Bond, Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases, Mol. Asp. Med. 29 (2008) 309–328.
[55] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, Methods Mol. Biol. 112 (1999) 531–552.
[56] E. Harlow, D. Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988.
[57] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
[58] J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G.A. Lajoie, B. Ma, PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, Mol. Cell Proteomics 11 (2012). M111 010587.
[59] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, Bioinformatics 22 (2006) 195–201.
[60] F. Kiefer, K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli, T. Schwede, The SWISS-MODEL Repository and associated resources, Nucleic Acids Res. 37 (2009) D387–D392.
[61] M.C. Peitsch, Protein modeling by E-mail, Biotechnology 13 (1995) 658–660.
[62] E. Dumermuth, E.E. Sterchi, W.P. Jiang, R.L. Wolz, J.S. Bond, A.V. Flannery, R.J. Beynon, The astacin family of metalloendopeptidases, J. Biol. Chem. 266 (1991) 21381–21385.
[63] W. Stocker, W. Bode, Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins, Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 383–390.
[64] J.S. Bond, R.J. Beynon, The astacin family of metalloendopeptidases, Protein Sci. 4 (1995) 1247–1261.
[65] F. Mohrlen, S. Baus, A. Gruber, H.R. Rackwitz, M. Schnolzer, G. Vogt, R. Zwilling, Activation of pro-astacin. Immunological and model peptide studies on the processing of immature astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus*, Eur. J. Biochem. 268 (2001) 2540–2546.
[66] B. Fischer, I. Sumner, P. Goodenough, Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in Escherichia coli as inclusion bodies, Arzneimittelforschung 42 (1992) 1512–1515.
[67] E.D.B. Clark, Refolding of recombinant proteins, Curr. Opin. Biotechnol. 9 (1998) 157–163.
[68] S. Reyda, E. Jacob, R. Zwilling, W. Stocker, cDNA cloning, bacterial expression, in vitro renaturation and affinity purification of the zinc endopeptidase astacin, Biochem. J. 344 (Pt 3) (1999) 851–857.
[69] A. Martinez, P.M. Knappskog, S. Olafsdottir, A.P. Doskeland, H.G. Eiken, R.M. Svebak, M. Bozzini, J. Apold, T. Flatmark, Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in Escherichia coli circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme, Biochem. J. 306 (Pt 2) (1995) 589–597.
[70] I. Arechaga, B. Miroux, M.J. Runswick, J.E. Walker, Over-expression of Escherichia coli F1F(o)-ATPase subunit a is inhibited by instability of the uncB gene transcript, FEBS Lett. 547 (2003) 97–100.
[71] M.P. Malakhov, M.R. Mattern, O.A. Malakhova, M. Drinker, S.D. Weeks, T.R. Butt, SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins, J. Struct. Funct. Genomics 5 (2004) 75–86.
[72] M. Satakarni, R. Curtis, Production of recombinant peptides as fusions with SUMO, Protein Expr. Purif. 78 (2011) 113–119.
[73] Z. Wang, N. Li, Y. Wang, Y. Wu, T. Mu, Y. Zheng, L. Huang, X. Fang, Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification, Protein Expr. Purif. 82 (2012) 174–178.
[74] T.R. Butt, S.C. Edavettal, J.P. Hall, M.R. Mattern, SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins, Protein Expr. Purif. 43 (2005) 1–9.
[75] Q. Ma, Z. Yu, B. Han, Q. Wang, R. Zhang, Expression and purification of lacticin Q by small ubiquitin-related modifier fusion in Escherichia coli, J. Microbiol. 50 (2012) 326–331.
[76] A. Prakash, S.J. Parsons, S. Kyle, M.J. McPherson, Recombinant production of self-assembling SZ-structured peptides using SUMO as a fusion partner, Microb. Cell Fact. 11 (2012) 92.
[77] D.R. Buch, F.N. Souza, G.O. Meissner, A.M. Morgon, L.H. Gremski, V.P. Ferrer, D. Trevisan-Silva, F.H. Matsubara, M. Boia-Ferreira, Y.B. Sade, D. Chaves-Moreira, W. Gremski, S.S. Veiga, O.M. Chaim, A. Senff-Ribeiro, Brown spider (Loxosceles genus) venom toxins: evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity, Toxicon 108 (2015) 154–166.
[78] L.D. dos Santos, N.B. Dias, J. Roberto, A.S. Pinto, M.S. Palma, Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action, Protein Pept. Lett. 16 (2009) 933–943.
[79] F.X. Gomis-Ruth, W. Stocker, R. Huber, R. Zwilling, W. Bode, Refined 1.8 A X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish Astacus astacus L. Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin, J. Mol. Biol. 229 (1993) 945–968.
[80] C. Tallant, R. Garcia-Castellanos, U. Baumann, F.X. Gomis-Ruth, On the relevance of the Met-turn methionine in metzincins, J. Biol. Chem. 285 (2010) 13951–13957.
[81] M.J. Foradori, E.K. Tillinghast, J.S. Smith, M.A. Townley, R.E. Mooney, Astacin family metallopeptidases and serine peptidase inhibitors in spider digestive fluid, Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 143 (2006) 257–268.
[82] G. Pfleiderer, R. Zwilng, H.H. Sonneborn, On the evolution of endopeptidases, 3. A protease of molecular weight 11,000 and a trypsin-like fraction from Astacus fluviatilis fabr, Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 348 (1967) 1319–1331.
[83] M.W. Mosesson, Fibrinogen and fibrin structure and functions, J. Thromb. Haemost. 3 (2005) 1894–1904.
[84] J.E. Schwarzbauer, D.W. DeSimone, Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3 (2011).
[85] J. Kruegel, N. Miosge, Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices, Cell Mol. Life Sci. 67 (2010) 2879–2895.
[86] A. Senff-Ribeiro, P. Henrique da Silva, O.M. Chaim, L.H. Gremski, K.S. Paludo, R. Bertoni da Silveira, W. Gremski, O.C. Mangili, S.S. Veiga, Biotechnological applications of brown spider (Loxosceles genus) venom toxins, Biotechnol. Adv. 26 (2008) 210–218.

Toxicon 108 (2015) 154–166

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity

Daniela Regina Buch [a], Fernanda Nunes Souza [a], Gabriel Otto Meissner [a], Adriano Marcelo Morgon [a], Luiza Helena Gremski [a, b], Valéria Pereira Ferrer [a], Dilza Trevisan-Silva [a], Fernando Hitomi Matsubara [a], Mariana Boia-Ferreira [a], Youssef Bacila Sade [a], Daniele Chaves-Moreira [a], Waldemiro Gremski [a, c], Silvio Sanches Veiga [a], Olga Meiri Chaim [a], Andrea Senff-Ribeiro [a, *]

[a] Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
[b] Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
[c] Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 June 2015
Received in revised form
2 September 2015
Accepted 29 September 2015
Available online 22 October 2015

Keywords:
Biological conservation
Loxosceles
Brown spider
Venom toxins
Recombinant toxins
Immune cross-reactivity

ABSTRACT

Loxosceles spiders are responsible for serious human envenomations worldwide. The collection of symptoms found in victims after accidents is called loxoscelism and is characterized by two clinical conditions: cutaneous loxoscelism and systemic loxocelism. The only specific treatment is serum therapy, in which an antiserum produced with *Loxosceles* venom is administered to the victims after spider accidents. Our aim was to improve our knowledge, regarding the immunological relationship among toxins from the most epidemiologic important species in Brazil (*Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* and *Loxosceles laeta*). Immunoassays using spider venoms and *L. intermedia* recombinant toxins were performed and their cross-reactivity assessed. The biological conservation of the main *Loxosceles* toxins (Phospholipases-D, Astacin-like metalloproteases, Hyaluronidase, ICK-insecticide peptide and TCTP-histamine releasing factor) were investigated. An *in silico* analysis of the putative epitopes was performed and is discussed on the basis of the experimental results. Our data is an immunological investigation in light of biological conservation throughout the *Loxosceles* genus. The results bring out new insights on brown spider venom toxins for study, diagnosis and treatment of loxoscelism and putative biotechnological applications concerning immune conserved features in the toxins.
© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Loxosceles spiders, also called brown spiders, are responsible for human envenomations worldwide. Different *Loxosceles* species have been found and reported in South America, Central America, North America, Europe, Africa, Middle East, Oceania and Asia (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Gremski et al., 2014). In South and Southeast Brazil, there are tree species of main medical importance, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* and *Loxosceles gaucho*; which are responsible for the most serious arachnid accident cases in the country (Barbaro et al., 1994; Dias-Lopes et al., 2010).

The spiders from the *Loxosceles* genus belong to the family *Loxoscelidae*, sub-order *Labidognatha*, order *Araneida*, class *Arachnida*, and phylo *Arthropoda* (Appel et al., 2005). *Loxosceles* spiders have a violin-shaped pattern on the dorsal surface of their cephalothorax and have six eyes arranged in non-touching pairs forming a U-shaped pattern (da Silva et al., 2004; Chaim et al., 2011a). The clinical manifestations following *Loxosceles* bites are called loxocelism and there are two clinical variants. Cutaneous loxoscelism is more common, occurs in approximately 83% of the cases, and is associated with necrotic skin lesions and gravitational spreading. Systemic loxoscelism includes renal failure; disseminated intravascular coagulation, intravascular hemolysis and may cause death in some victims (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006; Chaim et al.,

* Corresponding author. Centro Politécnico, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, UFPR, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.
E-mail address: senffribeiro@ufpr.br (A. Senff-Ribeiro).

http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.041
0041-0101/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2011a; Gremski et al., 2014).

Studies in molecular biology have contributed to the identification of a great number of brown spider toxins. The cloning and expression of recombinant toxins have been a very useful tool for improving our knowledge of loxoscelism and the biological functions of toxins, as well as for biotechnological purposes (Senff-Ribeiro et al., 2008; Chaim et al., 2011a; Gremski et al., 2014). Toxins from different organisms could be used as reference molecules in designing and developing new drugs, for industrial applications or directly for therapeutic and diagnostic use (Senff-Ribeiro et al., 2008; Chaim et al., 2011a; Mendes et al., 2013).

The venom of *Loxosceles* spiders is a complex mixture of protein and peptide toxins with a molecular mass profile ranging from 3 to 40 kDa (da Silva et al., 2004). Over recent years, *Loxosceles* genus spider venoms have been studied by several scientific research groups worldwide, and many different toxins have been identified in the venoms. Although studies have shown that venom components act synergistically, the mechanisms by which the venom exerts its effects are still under investigation (da Silva et al., 2004; Appel et al., 2005; Gremski et al., 2014). Herein, biological conservation of 5 classes of *Loxosceles* toxins was studied: phospholipases-D, astacins (metalloproteases), hyaluronidase, ICK (insecticide peptides) and TCTP (histamine releasing factor). The dermonecrotic toxins, phospholipases-D, are the better characterized toxins in brown spider venoms. A recombinant form of this toxin by itself can exert most of the biological effects described for the whole venom: the cutaneous and systemic manifestations such as dermonecrotic lesions, hematological disorders, and renal failure (da Silva et al., 2004; Ribeiro et al., 2007; da Silveira et al., 2007a; Chaim et al., 2011b). Astacin-like metalloproteases degrade gelatin, fibronectin, fibrinogen and entactin, but the mechanism by which these toxins play a role in the noxious effects of the venom have not been fully determined (Feitosa et al., 1998; Veiga et al., 2000, 2001a, b; da Silveira et al., 2007a). However, they could putatively be involved in the gravitational spreading of dermonecrosis (a hallmark of loxoscelism), as well as in hemorrhagic disturbances which were also observed following some accidents and acting as systemic spreading factors (Futrell, 1992; da Silveira et al., 2002; da Silva et al., 2004; da Silveira et al., 2007a; Trevisan-Silva et al., 2010). The hyaluronidase from *L. intermedia* is an endo-β-N-acetyl-D-hexosaminidase and is suggested to act with astacins in the gravitational spreading and in edema (Futrell, 1992; Young and Pincus, 2001; Barbaro et al., 2005; da Silveira et al., 2007b; Ferrer et al., 2013). Hyaluronidases are known to be involved in physiological and pathological processes ranging from fertilization to aging (Girish and Kemparaju, 2007). The insecticide toxins, which are peptides similar to knottins (molecules that form an inhibitor cystin knot, called ICKs) are the most abundant toxins in *L. intermedia* transcriptome (de Castro et al., 2004; Gremski et al., 2010). The peptide studied herein, named U2-SCRTX-Li1b, was recently characterized (Matsubara et al., 2013). A translationally controlled tumor protein family member (TCTP) was also identified in the *L. intermedia* venom gland and studied. This protein is related with the histaminergic effects of the venom (Gremski et al., 2010; Chaim et al., 2011a; Sade et al., 2012).

Recent studies showed that there is a family of intra-species as well as inter-species toxins in the *Loxosceles* spiders (Machado et al., 2005; Ribeiro et al., 2007; Trevisan-Silva et al., 2010). The presence of isoforms of toxins found throughout the genus can be explored as putative immune biotools if their immunogenic epitopes are conserved among the species (Trevisan-Silva et al., 2013; Gremski et al., 2014).

An immunological investigation of the *Loxosceles* toxins was mainly performed while taking into consideration the phospholipases-D toxins, specifically using LiD1 (Kalapothakis et al., 2002; Araujo et al., 2003; Felicori et al., 2006, 2009; Dias-Lopes et al., 2010). The aim of the present study was to investigate the biological conservation of the main *Loxosceles* toxins (Phospholipases-D, Astacin-like metalloproteases, Hyaluronidase, ICK insecticide peptide and TCTP). The cross-reactivity between the venom of the most important epidemiologic species in Brazil (*L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*) was assessed using immunoassays and recombinant toxins. A bioinformatics analysis of the putative epitopes is also discussed in relation to the experimental results. The data obtained took into account the biological conservation throughout the genus, and brings out putative biotechnological applications of the main brown spider venom toxins for study, diagnosis and the treatment of loxoscelism.

2. Material and methods

2.1. Reagents

SDS and Comassie blue were purchased from GibcoBRL (Grand Island, NY, USA). SDS-PAGE mass markers, BSA and Ponceau-S were purchased from Sigma (St. Louis, MI, USA). Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG were purchased from Promega (Madison, WI, USA). Secondary antibodies (anti-rabbit IgG) conjugated to horseradish peroxidase (Sigma) (St. Louis, MI, USA).

2.2. Loxosceles venoms and antibodies

Whole venom from *L. intermedia* obtained by electrostimulation (15 V) of the cephalothorax of spiders captured in the wild was solubilized in PBS and maintained frozen until used, as described by Feitosa et al., 1998. Polyclonal antibodies against *L. intermedia* whole venom were produced as previously described (Luciano et al., 2004). The *L. laeta* and *L. gaucho* whole venoms used in this work were a kind gift from CPPI (Center of Production and Research on Immunobiologicals-CPPI, Curitiba, Paraná, Brazil). These venoms were used to produce the antibodies against *L. laeta* and *L. gaucho* venoms in rabbits following the same protocol established for *L. intermedia* venom (Luciano et al., 2004). Antibodies integrity and reactivity were assayed by titration before the experimental procedures (data not shown).

2.3. L. intermedia recombinant toxins and antibodies

L. intermedia recombinant toxins were previously produced in procariotic expression systems as described (LiRecDT1 – Chaim et al., 2006; LiRecDT2 – da Silveira et al., 2006; LiRecDT3 – da Silveira et al., 2006; LiRecDT5 – da Silveira et al., 2007a; LiRecDT6 – Appel et al., 2008; LALP – Trevisan-Silva et al., 2010; TCTP – Sade et al., 2012). *L. intermedia* recombinant hyaluronidase (Ferrer et al., 2013). *L. intermedia* recombinant ICK peptide (Matsubara et al., 2013). Before their use, integrity, purity and concentration of recombinant toxins were assessed. Protein was quantified by Coomassie Blue method (BioRad, Hercules, USA). Polyclonal hiperimmune sera against each recombinant toxin were previously produced in rabbits by our group (anti-LiRecDT1- Chaim et al., 2006; anti-LALP – Trevisan-Silva et al., 2010; anti-TCTP – Sade et al., 2012). Anti-hyaluronidase and anti-ICK polyclonal sera were obtained as previously described (Ferrer et al., 2013 and Matsubara et al., 2013; respectively).

2.4. Electrophoresis and western blotting

The venom or recombinant protein concentrations were

determined by the Coomassie Blue method (BioRad, Hercules, USA) (Bradford, 1976). For recombinant toxins analysis, toxins (1, 2 or 5 μg) were submitted to 12.5% SDS-PAGE under reduced conditions; and for immunoblotting, proteins were transferred onto nitrocellulose filters and immunostained with hyperimmune rabbit serum that recognizes each one of *Loxosceles* venoms (*L. intermedia*, *L. laeta*, or *L. gaucho* whole venoms). Additionally, samples of *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* venoms (20 or 50 μg) were examined by western blotting using polyclonal antibodies against each recombinant toxin. After SDS-PAGE under reducing conditions, venoms were transferred to nitrocellulose and immunoblotted. Both western blottings were performed using polyclonal antibodies, alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG and BCIP/NBT for revelation. The molecular mass markers were acquired from Sigma. Western blottings analyses shown in this study were performed three times in the same conditions to confirm the results.

2.5. ELISA assays

ELISA plates (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) were coated with each of *Loxosceles* recombinant toxins (1 μg/100 μl/well, 2 h, room temperature). Plates were washed with phosphate buffered saline (PBS) and blocked with 1% bovine albumin (BSA) diluted in PBS (2 h, room temperature). After washing the plates with 0.1% Tween-PBS, they were incubated with primary antisera against *L. intermedia*, *L. laeta*, or *L. gaucho* whole venoms in different concentrations (2 h, room temperature). The plates were washed again and incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1 h, room temperature). Moreover, plates were coated with *L. intermedia*, *L. laeta*, or *L. gaucho* whole venoms (1 μg/100 μl/well, 2 h, room temperature) and incubated with primary antisera against each recombinant toxin in different concentrations, following the same protocol. The secondary antibodies were conjugated to horseradish peroxidase. The colorimetric reactions were developed using ortho-phenylenediamine (OPD) and stopped with concentrated sulfuric acid (1 M). Colorimetric results were measured at 490 nm using an automated microplate reader (Meridiam ELX 800 Bio-TEK Instruments, INC., Vermont, USA). ELISA assays were repeated at least three times and the samples were evaluated in pentaplicate in each experiment.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses of ELISAs results were performed using analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey test in the GraphPad InStat program version 3.00 for Windows 2000. Differences between hyperimmune and pre-immune sera were considered significant when $p < 0.05$.

2.7. Bioinformatic analysis

Linear B-cell epitopes for LiRecDT1 (*L. intermedia*) (PDB:3RLH) were predicted using four different algorithms: Kolaskar and Tongaonkar, ElliPro, BepiPred and Emini. The prediction made by Kolaskar and Tongaonkar determines possible antigenic segments of proteins by using a semi-empirical method which analyzes the physicochemical properties of amino acid residues, and their frequencies of occurrence in known linear epitopes. This method can predict antigenic determinants with about a 75% accuracy rate. The minimum, maximum, and threshold score values for the analyses were 0.8, 1.2 and 1.0 respectively, following the software default parameters. The amino acid window was set to 7 residues (Kolaskar and Tongaonkar, 1990). The ElliPro prediction method determines possible linear antigenic epitopes based on a 3D protein structure. A score is applied to each predicted epitope by the algorithm, defined as a PI (Protrusion Index) value averaged over epitope residues. A PI value given to each residue is used to predict the regions that are outside the ellipsoid (represented by an approximation of the 3D protein shape). The predicted epitopes with a PI score higher than 0.7 were determined as possible antigenic regions, following the default software parameters (Ponomarenko et al., 2008).

The BepiPred prediction determines possible linear antigenic regions based on a dataset of known epitopes. The algorithm employs a hidden Markov model and a propensity scale method to perform the prediction. Analyses performed using the BepiPred algorithm considers each amino acid independently. Therefore, the BepiPred algorithm was not applied with a minimum or maximum number of amino acids in determining a possible antigenic epitope. Since the sensitivity and specificity of the prediction is maximized at this point in the BediPred, a score value of 0.35 was set (Larsen et al., 2006). Emini surface accessibility determines the probability for possible linear epitopes being found on the surface of a protein. The accessibility profile is given based on a determined hexapeptide sequence. An epitope score greater than 1.0 indicates an increased probability for existance on the protein surface. The minimum, maximum and threshold score values for the analyses were 0.04, 4.9 and 1.0 respectively, following the software default parameters (Emini et al., 1985). The predictions using Kolaskar and Tongaonkar, BepiPred and Emini algorithms were performed at http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input. The prediction using ElliPro algorithm was performed at http://tools.immuneepitope.org/tools/ElliPro/iedb_input. The data were analyzed by the sequence alignment of *L. intermedia* LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecDT6, LiD1, *L. gaucho* LgRec1 and *L. laeta* LlRec1 phospholipases-D, performed with the software ClustalW2 at http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/.

3. Results

3.1. Immunological evaluation of the biological conservation of dermonecrotic toxins (PLDs) from Loxosceles ssp.

The immunological studies performed here aimed to verify the immunogenic epitopes conservation among the *Loxosceles* toxins from different species. ELISA and western blotting (WB) tests were employed to assess the antigenic cross-reactivity of the immune sera against the *L. intermedia*, *L. laeta* or *L. gaucho* whole venoms with the *L. intermedia* recombinant toxins, as well as the immune sera against the recombinant toxins with whole venoms. Our goal was to conduct a qualitative analysis, detecting the presence or absence of recognition by hyperimmune sera. Fig. 1 shows immunoassays using 5 recombinant isoforms of the dermonecrotic toxin (phospholipases-D: LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5 and LiRecDT6) from *L. intermedia* as antigens. The polyclonal immune sera against the *L. intermedia*, *L. laeta* or *L. gaucho* whole venoms were able to recognize these recombinant toxins by WB and ELISA (Fig. 1A–E and 1F–J, respectively). Pre-immune sera did not react in any of the assays. Fig. 2A and B show the immunological studies in which the venoms were immobilized as antigens. Aiming to study the dermonecrotic toxins, anti-LiRecDT1 serum was used; as the antibodies against this isoform are capable of recognizing the other ones (LiRecDT2, LiRecDT3, LiRedDT5 and LiRecDT6) (da Silveira et al., 2007a; Appel et al., 2008). The positive reaction in western blotting was within the expected molecular mass of dermonecrotic toxins (29–31 kDa). These results indicate that the *L. gaucho* and *L. laeta* venoms contain toxins related to *L. intermedia*

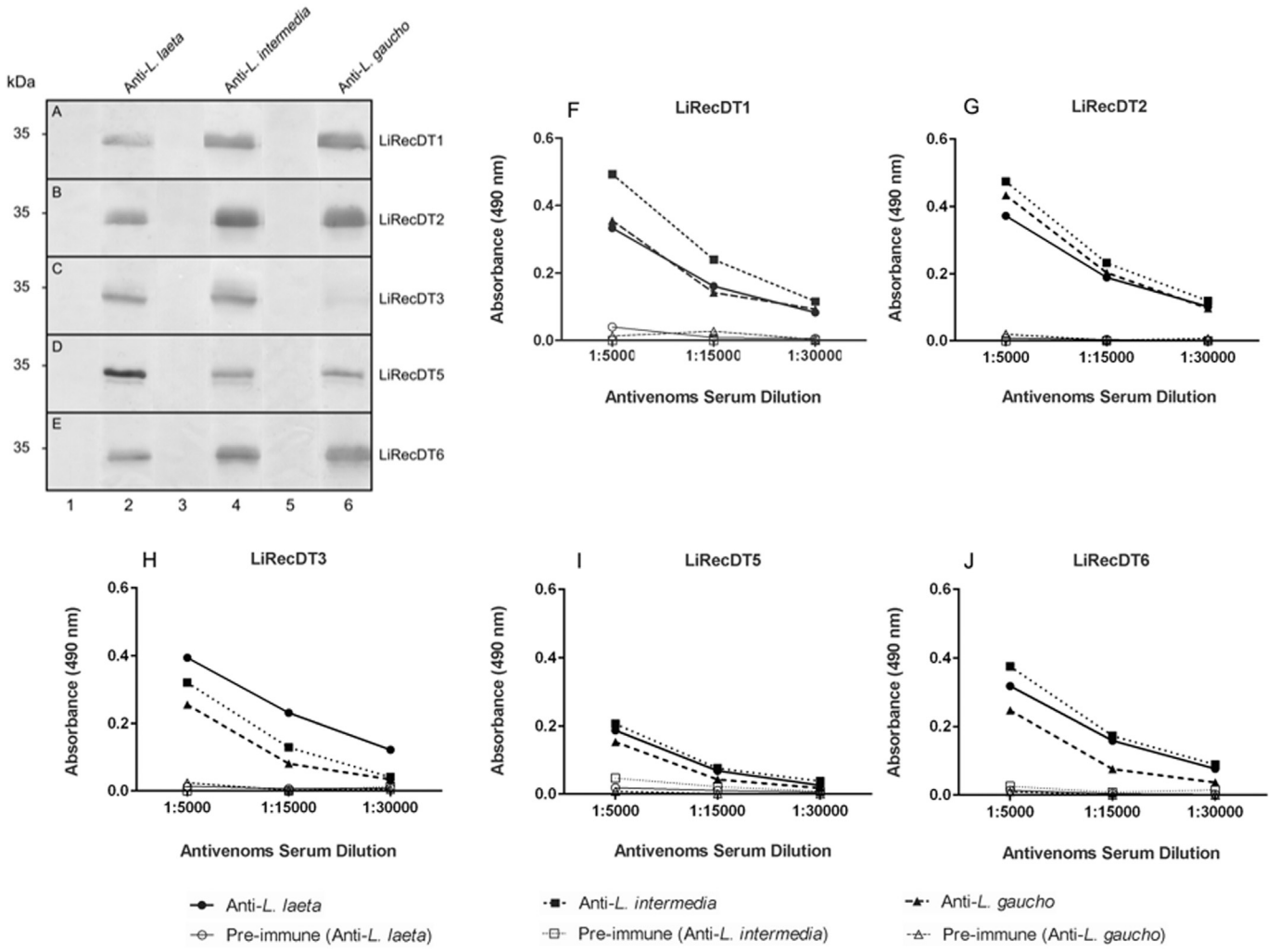


Fig. 1. Immunological cross-reactivity of antibodies against *Loxosceles* crude venoms and the recombinant dermonecrotic toxins (phospholipases-D) from *L. intermedia*. (A–E) Western-blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune sera of *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho*, respectively. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using antisera against *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venoms (1:1000), respectively. These immune detections were performed using purified *L. intermedia* recombinant dermonecrotic toxins (A) LiRecDT1, (B) LiRecDT2, (C) LiRecDT3, (D) LiRecDT5 and (E) LiRecDT6. Purified LiRecDTs toxins at a concentration of 1 μg were resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to antisera. A molecular mass marker is shown on the left (size in kDa). (F–J) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune sera and hyperimmune sera (see legend) against *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venoms, respectively, at the indicated dilutions (x-axis). Recombinant toxins (F) LiRecDT1, (G) LiRecDT2, (H) LiRecDT3, (I) LiRecDT5 and (J) LiRecDT6 at a concentration of 1 μg were immobilized on a solid phase.

dermonecrotic isoforms, LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5 and LiRecDT6.

3.2. Immunological evaluation of the biological conservation of astacin-like proteases (LALPs) from Loxosceles ssp.

Fig. 3 shows that *L. intermedia* LALP1, a metalloprotease from the astacin family, showed antigenic cross-reactivity in western-blotting and ELISA when polyclonal hyperimmune sera against the *L. laeta* and *L. gaucho* whole venoms were used. The immunoblotting analysis (Fig. 3A) suggests that the linear epitopes are maintained in toxin isoforms, and in the ELISA (3B), results point to recognition of the structural ones. The immune cross-reaction between *Loxosceles* venoms and hyperimmune antisera against *L. intermedia* recombinant toxins are presented in Fig. 3C and D. Positive recognition reactions both in western-blotting and ELISA corroborate for the idea of a biological conservation of astacins among the *Loxosceles* species tested; overlapping the results obtained in the first assays.

3.3. Immunological evaluation of the biological conservation of hyaluronidase from Loxosceles ssp.

Immunological studies using the *L. intermedia* hyaluronidase recombinant toxin showed that *L. laeta* and *L. gaucho* venoms contain toxins which are related to this enzyme (Fig. 4). Positive reactions in western-blotting (4A) and ELISA (4B–C) indicate that these venoms have toxins with linear and structural conserved epitopes as the *L. intermedia* hyaluronidase. When the second round of immunological evaluations was performed, the antibodies raised against the recombinant hyaluronidase from the *L. intermedia* venom recognized the related toxins in the *Loxosceles* venoms in ELISA (Fig. 4C). Nevertheless, western-blotting analyses (*L. intermedia* venom immobilized on the nitrocellulose) performed using anti-hyaluronidase antibodies (1:1000) showed a lack of positive reactions (data not shown).

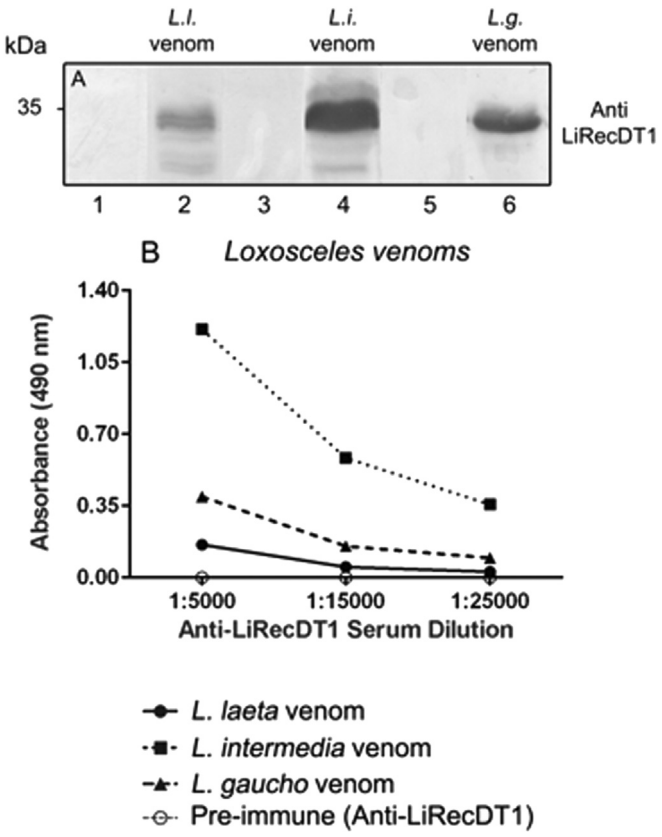


Fig. 2. Immunological cross-reactivity of antibodies against LiRecDT1 from *L. intermedia* and *Loxosceles* crude venoms. (A) Western-blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune serum of LiRecDT1 recombinant toxin. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using hyperimmune antiserum against LiRecDT1 (1:1000). *L. laeta* (lanes 1 and 2), *L. intermedia* (lanes 3 and 4) and *L. gaucho* (lanes 5 and 6) crude venoms, at a concentration of 20 μg, were resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to LiRecDT1 antiserum. A molecular mass marker is shown on the left (size in kDa). (B) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune serum and hyperimmune serum (see legend) against LiRecDT1 recombinant toxin, at the indicated dilutions (x-axis). *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venoms at a concentration of 1 μg/well were immobilized on a solid phase.

3.4. Immunological evaluation of the biological conservation of the ICK peptide from Loxosceles ssp.

The *L. intermedia* insecticidal peptide ICK (U2-SCRTX-Li1b) was recognized by the *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho* antisera in the ELISA assay (Fig. 5B). However, polyclonal antibodies against the *L. laeta* and *L gaucho* venoms did not recognize ICK in the experimental conditions of western blotting (Fig. 5A). On the other hand, a positive cross-reaction with the *L. intermedia* venom was detected at the expected molecular mass (5A). An immunological cross-reaction between the *Loxosceles* venoms and the anti-ICK polyclonal antibodies is shown in Fig. 5C and D. The *L. intermedia* venom exhibited a positive reaction at ~9 kDa (molecular mass of ICK) and ~24 kDa (putative multimeres of ICK peptides) (Fig. 5C). ICK-related toxins were recognized in *Loxosceles* venoms by ELISA (5D).

3.5. Immunological evaluation of the biological conservation of LiTCTP from Loxosceles ssp.

When the presence of biological conservation of TCTP toxins in the *Loxosceles* species was assayed by western blotting tests only the antiserum against *L. intermedia* was able to recognize this toxin (Fig. 6A). The polyclonal immune sera against the *L. intermedia*, *L. laeta* or *L. gaucho* whole venoms were able to recognize LiTCTP toxins by ELISA (6B). Notwithstanding, in the second round of immunological studies by western blotting, the LiTCTP antiserum was able to recognize toxins in all of the three venoms tested, indicating that there are related toxins with TCTP-conserved epitopes in *Loxosceles* venoms (Fig. 6C and D). The ELISA assay was performed using lower titles of the LiTCTP antiserum for immunological recognition (Fig. 6D).

3.6. Bioinformatic analysis of putative epitopes of LiRecDT1

Putative epitopes present in the sequence of LiRecDT1 were predicted using four different algorithms: Kolaskar and Tongaonkar, ElliPro, BepiPred and Emini (Fig. 7). Other dermonecrotic sequences were aligned for a comparison of homology and conservation of these predicted epitopes. Table 1 contains the identities among the different sequences and was prepared using BoxShade from Expasy to facilitate the analysis. Table 2 shows the identities of a known immunogenic epitope in LiD1 (Felicori et al., 2009) between the different phospholipases-D sequences.

4. Discussion

This study evaluated the biological conservation of *Loxosceles* toxins. ELISA and western blotting tests were employed to assess the antigenic cross-reactivity of immune sera raised against specific *L. intermedia* recombinant toxins with the whole venoms from the three species of brown spider studied: *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho*. In addition, the immunological recognition of three *Loxosceles* venoms was evaluated using hyperimmune sera against specific recombinant toxins. These investigations were proposed in order to study the immunological relationship between toxins from the same family present in different *Loxosceles* species of medical importance in Southern Brazil. Different concentrations of antibodies (antiserum titles) or different amounts of immobilized antigens (venom or recombinant toxins) were used in order to more accurately detect a positive reaction in immunoassays. A positive reaction using *L. intermedia* serum was predicted and also validates the technical procedures. The negative results in ELISA and/or western blotting did not point to the absence of related and/or conserved immunogenic epitopes among toxins from the *Loxosceles* venoms; the methods, limitations and interferences must be considered.

L. intermedia, *L. laeta*, and *L. gaucho* antisera venoms were able to identify the five isoforms of dermonecrotic toxins studied as antigens. Both, structural and linear epitopes from toxins were recognized (Fig. 1). Results indicate that these venoms contain toxins with epitopes that are related to the *L. intermedia* LiRecDT1 epitopes, probably molecules of the phospholipase-D family. Polyclonal antibodies raised against the LiRecDT1 recognized related isoforms, which have 30–35 kDa of molecular mass, in all of the *Loxosceles* venoms assayed. This data reinforces previous studies that identified a family of phospholipase-D toxins in brown spider venoms (Machado et al., 2005; dos Santos et al., 2009; Gremski et al., 2014). Various isoforms of phospholipase-D were already reported for different species (Gremski et al., 2010, 2014). For example, Machado et al. (2005) described eleven isoforms of phospholipase-D toxins in the venom of *L. gaucho*. Many isoforms of the dermonecrotic toxin were also characterized in the venom of other species such as *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles boneti* and *L. laeta* (Ramos-Cerrillo et al., 2004; Binford et al., 2009). In the *L. intermedia* transcriptome, several isoforms were described, and nine isoforms were already

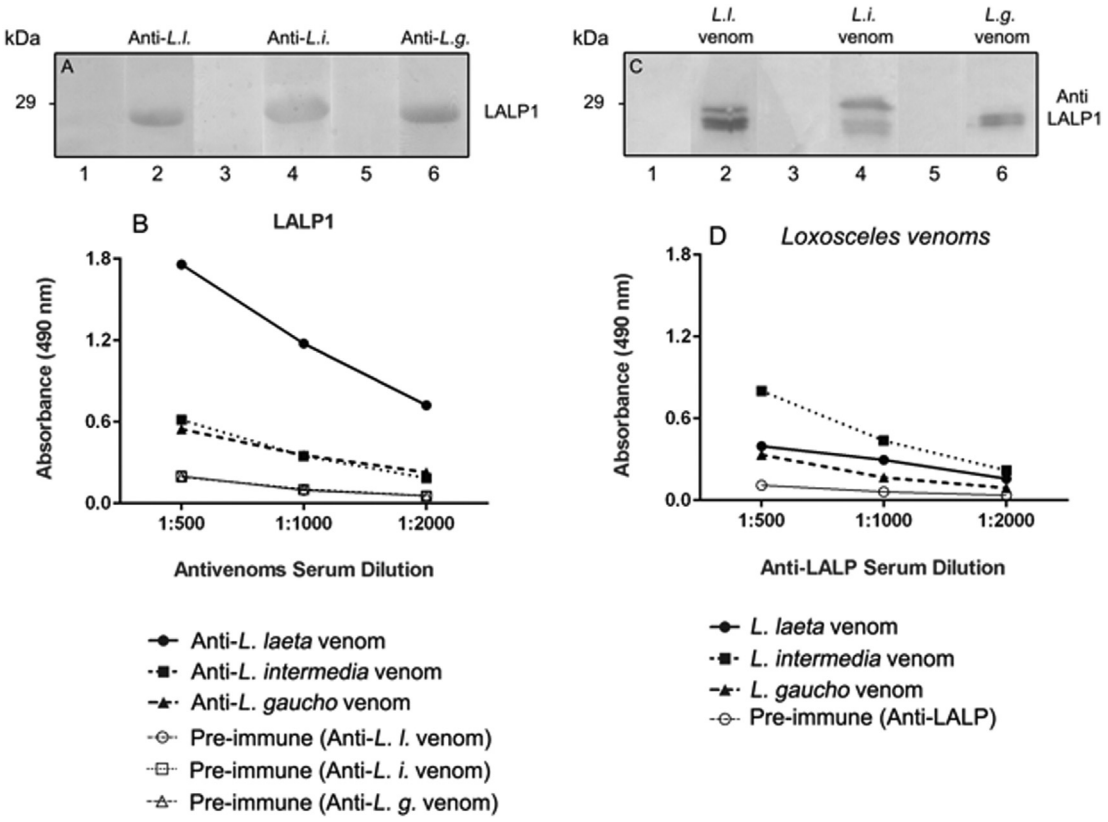


Fig. 3. Immunological cross-reactivity of LALP1, *L. intermedia* metalloprotease, and *Loxosceles* crude venoms. (A) Western blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune sera of *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho*, respectively. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using antisera against *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venom (1:1000), respectively. These immune detections were performed using purified *L. intermedia* recombinant toxin LALP1. Purified LALP1 toxin at a concentration of 5 μg was resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to antisera. (B) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune sera and hyperimmune sera (see legend) against *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venoms, respectively, at the indicated dilutions (x-axis). LALP1 recombinant toxin at a concentration of 5 μg/well was immobilized on a solid phase. (C) Western blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune serum of LALP1 recombinant toxin. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using hyperimmune antiserum against LALP1 (1:1000). *L. laeta* (lanes 1 and 2), *L. intermedia* (lanes 3 and 4) and *L. gaucho* (lanes 5 and 6) crude venoms, at a concentration of 20 μg, were resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to LALP1 antiserum. A molecular mass marker is shown on the left (size in kDa). (D) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune serum and hyperimmune serum (see legend) against LALP1 recombinant toxin, at the indicated dilutions (x-axis). *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venoms at a concentration of 1 μg/well were immobilized on a solid phase.

expressed as recombinant proteins (Kalapothakis et al., 2007; Gremski et al., 2014). Recently, we have shown that antibodies raised against LiRecDT1 were able to recognize at least 25 spots in 2D-immunoblotting, using *L. intermedia* crude venom (Wille et al., 2013). Although this study is a qualitative analysis, a difference of recognition intensity in some of the results can be observed among different sera recognizing the same toxin (e.g. LiRecDT3 and antiserum against *L. gaucho*), as well as the same antiserum recognizing different toxins (e.g. antiserum against *L. laeta* and LiRecDTs 3 and 5). The differential venom content among the three species studied and toxin representation inside venoms cannot be disregarded, as well as individual toxin capabilities to elicit an *in vivo* protective immune response in the animals in which the antiserum was raised. These observations relating to the unfeasible quantitative analysis of immunological studies performed herein can be extended to other toxins assayed. In this study, we also performed assays with the immobilized *Loxosceles* venoms, and used antisera raised against *L. intermedia* recombinant toxins, where the quantities of each toxin in the whole venom must be regarded. Low intensity ELISA results could be due to low amounts of the specific toxin adsorbed on ELISA plates. Nevertheless, it should be taken into account the molecular and physical properties of the toxin may interfere in the interaction with plastic plates. Some immunological conservation relations, which could not be established in the first part of the studies (using antisera against *Loxosceles* crude venoms), were determined by using the antiserum raised against the different *L. intermedia* recombinant toxins. Our results with dermonecrotic toxin isoforms are in agreement with previous data that point to phospholipases-D as a family of toxins with different related isoforms. These toxins have biological, amino acid and immunological similarities, and which are found in diverse *Loxosceles* species (Ribeiro et al., 2007; Gremski et al., 2010). Considering that phospholipases-D are able to reproduce the major biological effects triggered by whole venom and the immunological data shown here, the dermonecrotic toxins rise as great candidates for the development of new immune strategies in Loxoscelism diagnosis and treatment. Besides the strong identity among the nucleotide and amino acid sequence of the dermonecrotic toxins previously reported (Gremski et al., 2010), we show herein, that they contain the immunogenic epitopes conserved among the species and probably throughout the genus.

The results obtained using the LALP1 recombinant toxin and its antibodies, corroborate with previous data that suggested a family of astacin in *L. intermedia* and throughout the genus (Trevisan-Silva et al., 2010; 2013). Additionally, herein the conservation of

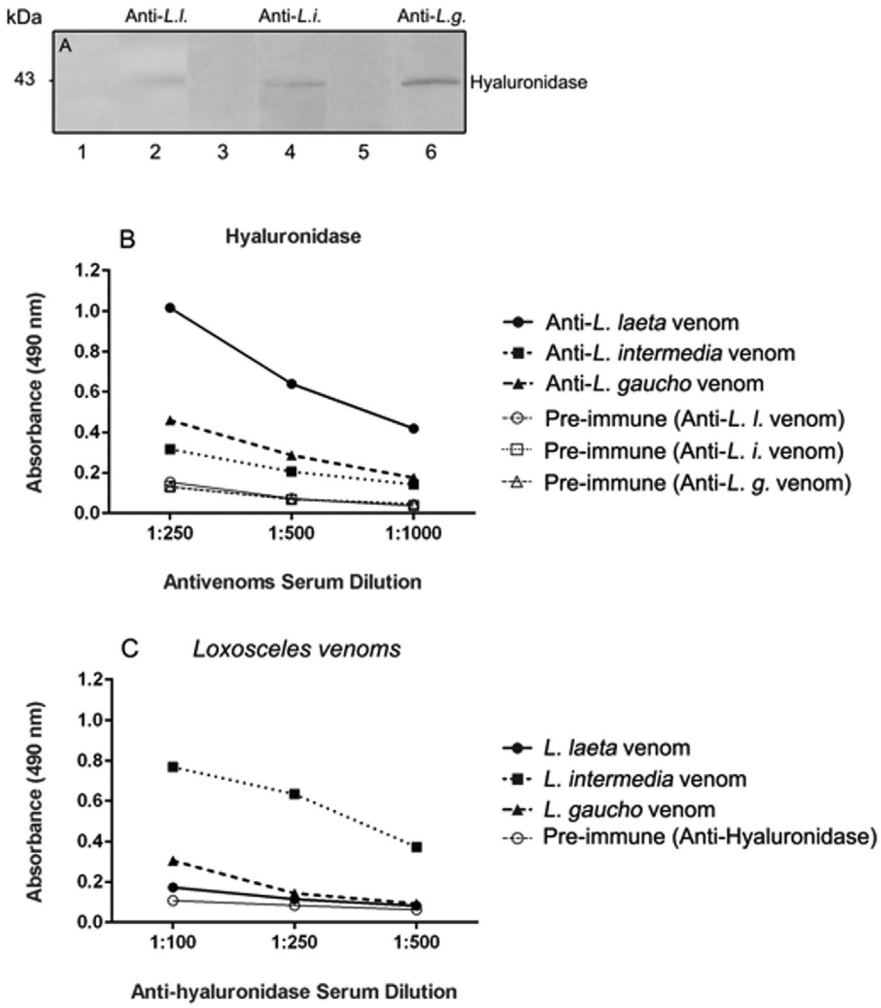


Fig. 4. Immunological cross-reactivity of *L. intermedia* hyaluronidase and *Loxosceles* crude venoms. (A) Western blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune sera of *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho*, respectively. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using antisera against *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venom (1:1000), respectively. These immune detections were performed using purified *L. intermedia* hyaluronidase recombinant toxin. Purified hyaluronidase toxin at a concentration of 5 μg was resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to antisera. (B) Antibody-capture ELISAs were carried out using preimmune sera and hyperimmune sera (see legend) against *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venoms, respectively, at the indicated dilutions (x-axis). Hyaluronidase recombinant toxin at a concentration of 5 μg/well was immobilized on a solid phase. (C) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune serum and hyperimmune serum (see legend) against hyaluronidase recombinant toxin, at the indicated dilutions (x-axis). *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venoms at a concentration of 1 μg/well were immobilized on a solid phase.

structural and linear immunogenic epitopes, in the *Loxosceles* astacin family, is shown by immunodetection assays.

Recognition of the *L. intermedia* hyaluronidase by antisera against *L. laeta* and *L. gaucho*, also indicates an immunogenic conservation among toxins from the different species. A variation of intensity can be observed (Fig. 4), although any quantitative analysis is inappropriate. The evidence suggests a low representation of this toxin in the *Loxosceles* venoms. Both *L. intermedia* and *L. laeta* transcriptome analysis showed that only 0.1% of transcripts are encoded for hyaluronidase (Gremski et al., 2010; Fernandes-Pedrosa et al., 2008; respectively). The absence of recognition or low recognition of the ICK and LiTCTP recombinant toxins by the *L. gaucho* and *L. laeta* polyclonal antibodies can be due to more than one reason. ICK belongs to a family of insecticidal peptides that comprises 53.5% of the transcripts from the *L. intermedia* venom gland transcriptome (Gremski et al., 2010). The absence of recognition by *L. laeta* antiserum can be explained by the fact that the peptides described in the *L. intermedia* venom are different from peptides described in the *L. laeta* venom gland transcriptome (Fernandes-Pedrosa et al., 2008). Although these peptides are abundant in venoms, they are also heterogeneous and the variations lead not only to different selectivity but also to diverse modes of interaction between the peptides and their receptors (de Castro et al., 2004; Gremski et al., 2010).

When LiTCTP results are analyzed, the absence of reaction (*L. laeta* and *L. gaucho* antisera) and the discrete recognition by the serum produced using this toxin can be due to TCTP features: TCTP is a housekeeping protein, highly conserved and found in a wide range of cells (Tuynder et al., 2004; Bommer and Thiele, 2004; Amson et al., 2013). Due to its constitutive nature, it could be very difficulty to raise an immune response in animals used to produce the antiserum. Nevertheless, the antiserum for the *L. intermedia* venom was produced in the same way. Another point that must be considered is its representation in *Loxosceles* venoms. The *L. intermedia* transcriptome study suggests that TCTP consists of 0.4% of the transcripts (Gremski et al., 2010; Sade et al., 2012). There is no information in the literature about the presence of

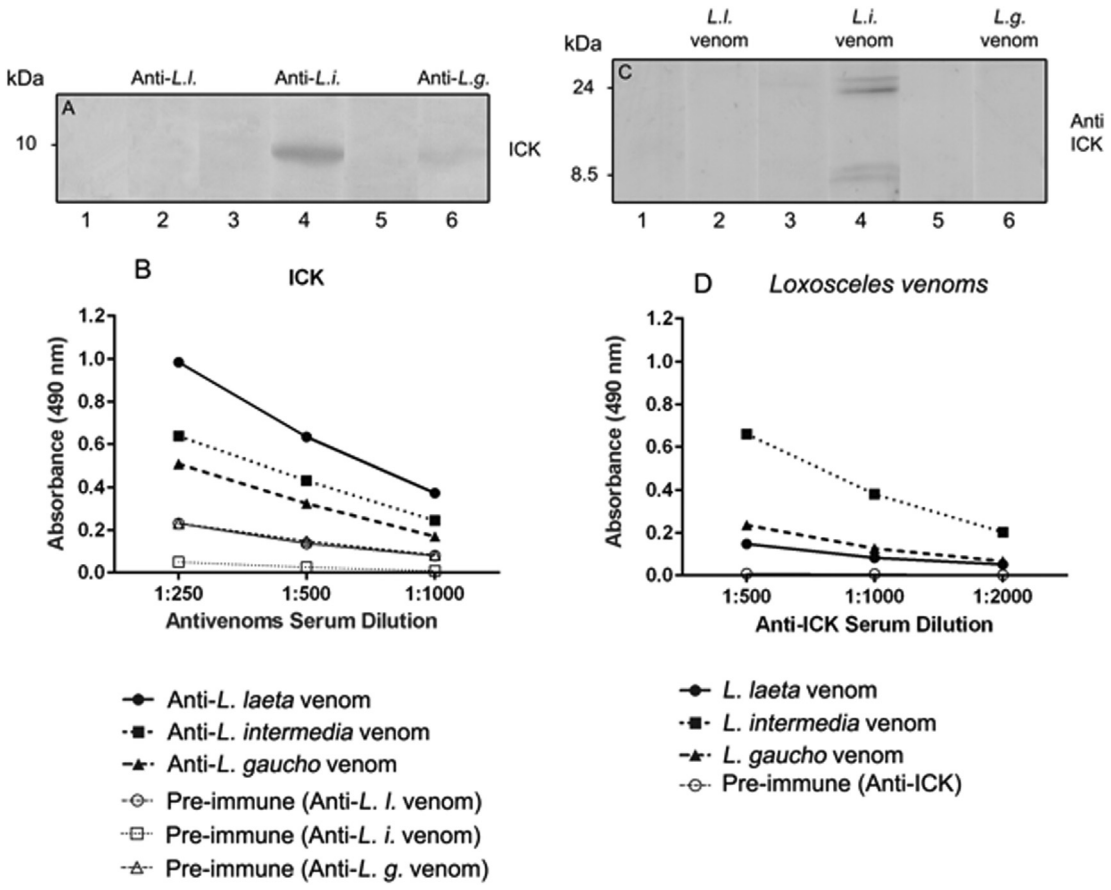


Fig. 5. Immunological cross-reactivity of ICK, *L. intermedia* insecticidal peptide, and *Loxosceles* crude venoms. (A) Western blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune sera of *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho*, respectively. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using antisera against *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venom (1:1000), respectively. These immune detections were performed using purified *L. intermedia* recombinant toxin ICK. Purified ICK toxin at a concentration of 5 μg was resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to antisera. (B) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune sera and hyperimmune sera (see legend) against *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venoms, respectively, at the indicated dilutions (x-axis). ICK recombinant toxin at a concentration of 5 μg/well was immobilized on a solid phase. (C) Western-blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune serum of ICK recombinant toxin. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using hyperimmune antiserum against ICK (1:1000). *L. laeta* (lanes 1 and 2), *L. intermedia* (lanes 3 and 4) and *L. gaucho* (lanes 5 and 6) crude venoms, at a concentration of 50 μg, were resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to ICK antiserum. A molecular mass marker is shown on the left (size in kDa). (D) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune serum and hyperimmune serum (see legend) against ICK recombinant toxin, at the indicated dilutions (x-axis). *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venoms at a concentration of 1 μg/well were immobilized on a solid phase.

TCTP in *L. gaucho* and *L. laeta* venoms. When the antiserum that recognizes LiTCTP was employed in ELISA and WB using whole venom as an immobilized antigen, it was able to react with related proteins in venoms of the three species (*L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho*). Showing that there are toxins in these *Loxosceles* venoms with the conserved immunogenic epitopes observed in LiTCTP, the positive reaction in the molecular mass of LiTCTP (~24 kDa) is the first evidence that points to TCTP as a conserved toxin in the *Loxosceles* genus and present in different species of the brown spider.

In the last part of this study, we examined the putative epitopes through prediction software analysis using the protein sequence of LiRecDT1, a recombinant protein used to produce the antibodies that detect the conservation of immunogenic epitopes among these sequences. This toxin sequence was compared to other isoforms from *L. intermedia*, as well as the toxins in the same family but from *L. laeta* and *L. gaucho*. The recent molecular biology methodologies introduced in the field of *Loxosceles* toxinology analyze a large amount of sequence data which allowed identity studies among sequences (Table 1). Nevertheless, a strong positive identity among sequences cannot always be translated into immunogenic epitope conservation; therefore analysis should be more detailed. There are several software programs available that predict immunogenic epitopes through different methods. Herein we used four programs: Kolaskar, Emini, Ellipro and Bepipred (detailed features in Material and Methods). The results obtained with the epitope bioinformatics prediction method were correlated with immunoassays results; however, not completely. This was expected, as in the immunoassays, much interference can occur, but mainly, the representation of each one of the toxins in the whole venom cannot be disregarded. It should be mentioned that LiRecDT3 counts for 14,2% of the PLD transcripts in the study of the *L. intermedia* venom gland transcriptome, LiRecDT1 represented 43% of the transcripts in the same study (Gremski et al., 2010). The prediction of epitopes using the bioinformatic analysis was already performed in the context of Loxoscelism: Felicori and cols. (2009), analyzed experimentally (*in vivo*) several antigenic predicted regions of the LiD1 (13–27, 31–45, 58–72, 100–114, 160–174 and 247–261) and only one of these predicted epitopes showed immunogenicity. The CKKYENFNDFLKGLR peptide is localized on the position 58–72 of the sequences aligned in Fig. 7. In our study

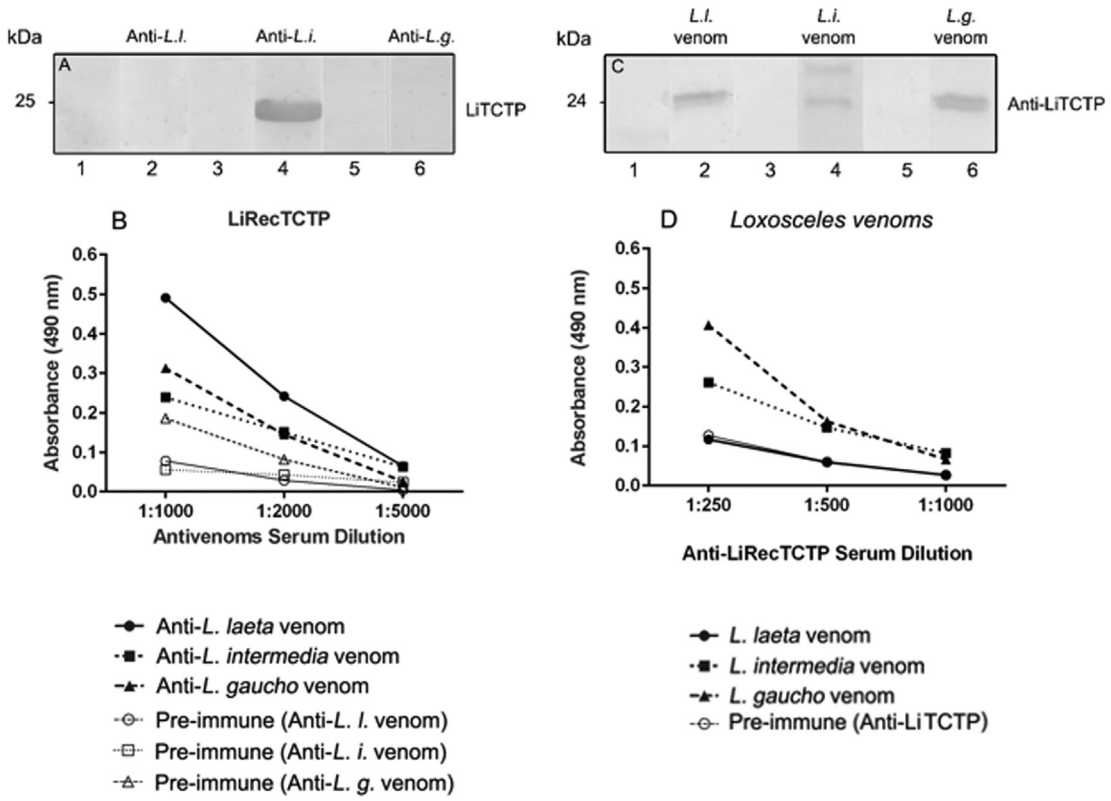


Fig. 6. Immunological cross-reactivity of *L. intermedia* TCTP and *Loxosceles* crude venoms. (A) Western blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune sera of *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho*, respectively. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using antisera against *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venom (1:1000), respectively. These immune detections were performed using purified *L. intermedia* recombinant toxin LiTCTP. Purified LiTCTP toxin at a concentration of 5 μg was resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to antisera. (B) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune sera and hyperimmune sera (see legend) against *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venoms, respectively, at the indicated dilutions (x-axis). LiTCTP recombinant toxin at a concentration of 5 μg/well was immobilized on a solid phase. (C) Western-blotting, Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune serum of LiTCTP recombinant toxin. Lanes 2, 4 and 6 are reactions using hyperimmune antiserum against LiTCTP (1:1000). *L. laeta* (lanes 1 and 2), *L. intermedia* (lanes 3 and 4) and *L. gaucho* (lanes 5 and 6) crude venoms, at a concentration of 50 μg, were resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to LiTCTP antiserum. A molecular mass marker is shown on the left (size in kDa). (D) Antibody-capture ELISAs were carried out using pre-immune serum and hyperimmune serum (see legend) against LiTCTP recombinant toxin, at the indicated dilutions (x-axis). *L. laeta*, *L. intermedia* and *L. gaucho* crude venoms at a concentration of 1 μg/well were immobilized on a solid phase.

this peptide was partially recognized as a putative epitope by two different prediction methods (Emini and Ellipro). An analysis of the LiRecDT1 structure obtained by crystallography (PDB 3RLH) shows that the beginning of this sequence (58–60) is on a loop of the protein, followed by a small β-sheet (61–62) and a α-helix (63–72). Accessibility analysis of the crystal structure shows that the residues 58–60, 64, 65, 68, 71, 72 are exposed. This analysis considers the exposure of mainly residues in the loops of the protein (aminoacids considered accessible by Deep View in LiRecDT1 are marked with an asterisk in Fig. 7). When this confirmed immunogenic region sequence is observed on the different toxins, a lack of conservation is observed for the *L. gaucho* (LgRec1), LiRecDT3, LiRecDT5 and LiREcDT6 (see also Table 2). This difference could explain the light recognition of LiRecDT3 by the *L. gaucho* serum in western blotting (Fig. 1C). Smaller values of absorbance on the ELISA assays were also observed on LiRecDT3, LirecDT5 and LiRecDT6. The percentage of identity in the immunogenic peptide could corroborate to the lighter signals in the LiRecDT1 and the LiRecDT2 western blotting samples, as well as ELISAs with the anti-*L. gaucho* sera. These observations corroborate with the results from Felicori et al. (2009). This should be considered in the studies of new anti-sera strategies and the development of vaccines for Loxoscelism. The prediction and confirmation of epitopes must be done using different techniques and approaches. Recently, Dias-Lopes et al. (2014) showed the neutralization capacity of a LiD1mAb that recognizes a highly conserved linear epitope localized in the catalytic region of the dermonecrotic toxin from *L. intermedia*. This epitope, FDDNANPEYTYHGIP, is localized on the position 37–51 and was completely or partially recognized as a putative immunogenic peptide by all the four prediction methods (Fig. 7). Analyzing the alignment, there is a lack of amino acid conservation of this region among LiRecDT1/LiD1 and LiRecDT3, LirecDT5 and LiRecDT6. These observations reinforce our experimental and bioinformatic data.

The antisera produced with the *Loxosceles* venoms have been used as bioproducts for serum therapy after spider accidents (for more information, see Senff-Ribeiro et al., 2008). The neutralization of the dermonecrotic toxin activity by antibodies has been shown in several studies (Pauli et al., 2009; Chatzaki et al., 2012). Monoclonal antibodies were also produced against the dermonecrotic toxins from the *L. gaucho* venom. These reagents neutralized the dermonecrotic and lethal activities of the whole venom (Guilherme et al., 2001). Recently, different peptide epitopes from the representative toxins in the *Loxosceles* venoms were studied concerning their neutralizing potencies (Ramada et al., 2013). Additionally, the use of recombinant dermonecrotic toxins or their immunogenic peptides would generate a monospecific antiserum

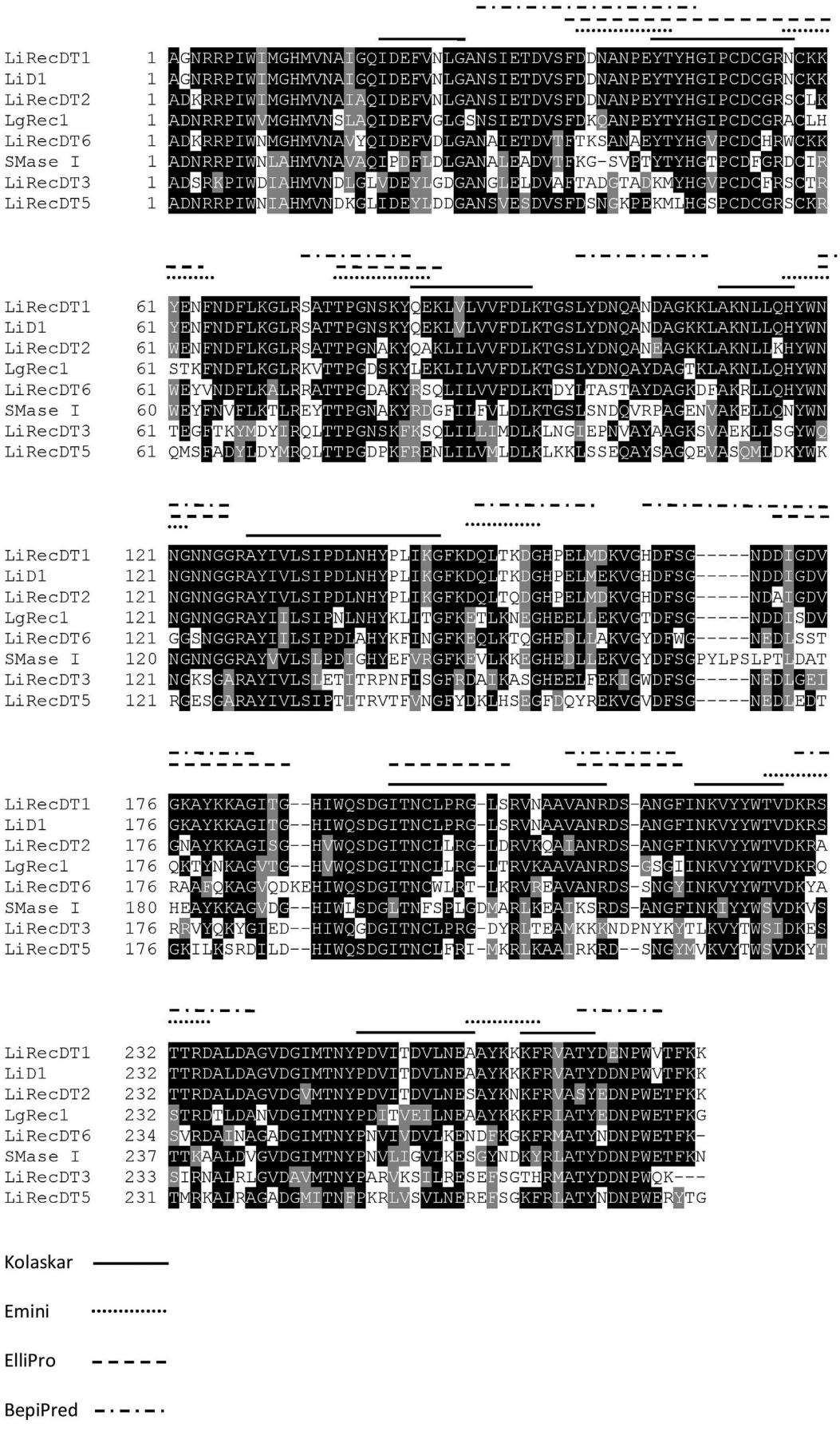


Fig. 7. Epitope prediction based on LiRecDT1 sequence and multiple sequence alignment analysis. Epitope prediction of LiRecDT1 was performed using four different algorithms: Kolaskar and Tongaonkar, ElliPro, BepiPred and Emini (the predicted epitopes are shown as different line types on the top of the sequences. Alignment with LIRecDT1 was performed using the cDNA-deduced amino acid sequences for the other *Loxosceles intermedia* dermonecrotic toxins (LiRecDTs) and the phospholipases-D from other species of *Loxosceles*. Sequences were aligned using the CLUSTAL W2 program (www.ebi.ac.uk/CLUSTAL). Amino acid identities are shaded in black, and conservative substitutions are in gray (the percentage of identity is shown in Table 1). Accession numbers: LiRecDT1: ABA62021; LiD1: POCE81; LiRecDT2: ABB69098; LiRecDT3: ABB71184; LiRecDT5: ABD91847; LiRecDT6: ABO87656; LgRec1: K9USW8 (*L. gaucho*); SMaseI: Q8I91 (*L. laeta*).

Table 1
Identity profiles among dermonecrotic toxins from *Loxosceles*. Analysis based on the multiple alignments of the cDNA-deduced amino acid sequences for the *Loxosceles intermedia* dermonecrotic toxins (LiRecs/LiD1) and phospholipases-D from other species of *Loxosceles*. *L. intermedia* – LiRecDT1-6 and LiD1; *L. laeta* – SMaseI and *L. gaucho* – LgRec1. Accession numbers: LiRecDT1: ABA62021; LiD1: POCE81; LiRecDT2: ABB69098; LiRecDT3: ABB71184; LiRecDT5: ABD91847; LiRecDT6: ABO87656; LgRec1: K9USW8; SMaseI: Q8I914.

Loxosceles dermonecrotic toxins identity profile								
	LiRecDT1	LiD1	LiRecDT2	LiRecDT3	LiRecDT5	LiRecDT6	LgRec1	SMaseI
LiRecDT1	100%	100%	90%	47%	52%	67%	78%	58%
LiD1	100%	100%	90%	47%	52%	67%	78%	58%
LiRecDT2	90%	90%	100%	46%	51%	67%	77%	60%
LiRecDT3	47%	47%	46%	100%	55%	47%	45%	45%
LiRecDT5	52%	52%	51%	55%	100%	51%	50%	48%
LiRecDT6	67%	67%	67%	47%	51%	100%	67%	59%
LgRec1	78%	78%	77%	45%	57%	67%	100%	50%
SMaseI	58%	58%	60%	45%	48%	59%	50%	100%

Table 2
Identity Profiles of Dermonecrotic Epitope 58–72 between different toxins from *Loxosceles* spiders. Analysis based on the multiple alignment analysis of the cDNA-deduced amino acid sequences of the epitope 58–72 for the *Loxosceles* toxins. *L. intermedia* – LiRecDT1-6 and LiD1; *L. laeta* – SMaseI and *L. gaucho* – LgRec1. LiRecDT1: CKKYENFNDFLKGLR; LiD1: CKKYENFNDFLKGLR; LiRecDT2: CLKWENFNDFLKGLR; LiRecDT3: CTRTEGFTKYMDYIR; LiRecDT5: CKRQMSFADYLDYMR; LiRecDT6: CKKWEYVNDFLKALR; LgRec1: CLHSTKFNDFLKGLR; SMaseI: CIRWEYFNVFLKTLR.

Loxosceles dermonecrotic toxins epitope 58–72 identity profile								
	LiRecDT1	LiD1	LiRecDT2	LiRecDT3	LiRecDT5	LiRecDT6	LgRec1	SMaseI
LiRecDT1	100%	100%	86.7%	26.7%	40%	73.3%	66.7%	60%
LiD1	100%	100%	86.7%	26.7%	40%	73.3%	66.7%	60%
LiRecDT2	86.7%	86.7%	100%	26.7%	33.3%	73.3%	73.3%	66.7%
LiRecDT3	26.7%	26.7%	26.7%	100%	46.7%	20%	20%	33.3%
LiRecDT5	40%	40%	33.3%	46.7%	100%	33.3%	33.3%	33.3%
LiRecDT6	73.3%	73.3%	73.3%	20%	33.3%	100%	53.3%	66.7%
LgRec1	66.7%	66.7%	73.3%	20%	33.3%	53.3%	100%	53.3%
SMaseI	60%	60%	66.7%	33.3%	33.3%	66.7%	53.3%	100%

that could be used at lower doses, thereby decreasing the possible side effects in serum therapy. The use of recombinant toxins would also avoid the need of capturing spiders in the nature and the extraction their venom.

Other studies have already demonstrated that using recombinant toxins in the *Loxosceles* anti-venom production and therapy results could be improved, and suggest that the crude venom should be replaced (de Moura et al., 2011; Mendes et al., 2013; Duarte et al., 2015). A recently published study showed a new immunization strategy that uses a chimeric protein (constructed expressing three epitopes of rLiD1) (Figueiredo et al., 2014). The data obtained in this study also suggests that specific toxin parts or sequences (immunogenic epitopes), which are conserved among *Loxosceles* species, could be used as targets for better immunotools and therapeutic procedures.

5. Conclusions

Nowadays, Loxoscelism diagnosis is based on epidemiological and historical findings or clinical signs and symptoms after accidents. Moreover, a laboratory diagnosis kit is currently unavailable and experimental methods are under evaluation (Chávez-Olórtegui et al., 1998; Alvarenga et al., 2003; da Silva et al., 2004; Senff-Ribeiro et al., 2008). Different studies, available in the literature, have already used synthetic peptides, corresponding to epitopes of certain toxins, to antivenom preparation and evaluation (Felicori et al., 2009). But this is the first approach in immunogenic conservation and cross-reactivity of the main loxoscelic toxins and the *Loxosceles* venoms. We point herein that immunogenic epitopes from the main *Loxosceles* toxins are conserved within the species, resulting in valuable tools for a unique approach in envenomation diagnosis and treatment.

Acknowledgments

We would like to thank CPPI (Center of Production and Research on Immunobiologicals, Curitiba, Paraná, Brazil) for the venoms from *L. laeta* and *L. gaucho*. This work was supported by grants from CAPES, CNPq, Fundação Araucária-PR and Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Brazil.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.041.

References

Alvarenga, L.M., Martins, M.S., Moura, J.F., Kalapothakis, E., Oliveira, J.C., Mangili, O.C., Granier, C., Chávez-Olórtegui, C., 2003. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of Loxosceles intermedia spider venom and their use in a specific immunometric assay. Toxicon 42 (7), 725–731.

Amson, R., Pece, S., Marine, J.C., Di Fiore, P.P., Telerman, A., 2013. TPT1/TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. Trends Cell Biol. 23 (1), 37–46.

Appel, M.H., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Veiga, S.S., 2005. Insights into brown spider and loxoscelism. Invertebr. Surviv J. 2, 152–158.

Appel, M.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Paludo, K.S., Silva, D.T., Chaves, D.M., da Silva, P.H., Mangili, O.C., Senff-Ribeiro, A., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. Biochim. Biophys. Acta 1780, 167–178.

Araujo, S.C., Castanheira, P., Alvarenga, L.M., Mangili, O.C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2003. Protection against dermonecrotic and lethal activities of Loxosceles intermedia spider venom by immunization with a fused recombinant protein. Toxicon 41 (3), 261–267.

Barbaro, K.C., Eickstedt, V.R., Mota, I., 1994. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important Loxosceles (Araneae) species in Brazil. Toxicon 32 (1), 113–120.

Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic

activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. Toxicon 45, 489–499.
Binford, G.J., Bodner, M.R., Cordes, M.H., Baldwin, K.L., Rynerson, M.R., Burns, S.N., Zobel-Thropp, P.A., 2009. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. Mol. Biol. Evol. 26, 547–566.
Bommer, U.A., Thiele, B.J., 2004. The translationally controlled tumour protein (TCTP). Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 379–385.
Bradford, M.A., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chavez-Olortegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 211, 64–77.
Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2011a. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. Toxins 3, 309–344.
Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Boia-Ferreira, M., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Takahashi, H.K., Toledo, M.S., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2011b. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. Biochim. Biophys. Acta 1811 (2), 84–96.
Chatzaki, M., Horta, C.C., Almeida, M.O., Pereira, N.B., Mendes, T.M., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Moro, L., Chávez-Olórtegui, C., Horta, M.C., Kalapothakis, E., 2012. Cutaneous loxoscelism caused by Loxosceles similis venom and neutralization capacity of its specific antivenom. Toxicon 60 (1), 21–30.
Chávez-Olórtegui, C., Zanetti, V.C., Ferreira, A.P., Minozzo, J.C., Mangili, O.C., Gubert, I.C., 1998. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by Loxosceles intermedia spiders. Toxicon 36 (4), 563–569.
da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spiders and loxoscelism. Toxicon 44, 693–709.
da Silveira, R.B., dos Santos Filho, J.F., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., Nader, H.B., von Dietrich, C.P., 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. Toxicon 40, 815–822.
da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. Biochimie 88, 1241–1253.
da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., Gremski, W., 2007a. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. Biochimie 89, 289–300.
da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007b. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-dhexosaminidases hydrolases. Toxicon 49, 758–768.
de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Araujo, S.C., Gabriel de, M.Y., Mangili, O.C., Cruz, I., ChavezOlortegui, C., Kalapothakis, E., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. Toxicon 44, 273–280.
de Moura, J., Felicori, L., Moreau, V., Guimarães, G., Dias-Lopes, C., Molina, L., Alvarenga, L.M., Fernandes, P., Frézard, F., Ribeiro, R.R., Fleury, C., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olórtegui, C., 2011. Protection against the toxic effects of Loxosceles intermedia spider venom elicited by mimotope peptides. Vaccine 29 (45), 7992–8001.
dos Santos, L.D., Dias, N.B., Roberto, J., Pinto, A.S., Palma, M.S., 2009. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. Protein Pept. Lett. 16, 933–943.
Dias-Lopes, C., Guimaraes, G., Felicori, L., Fernandes, P., Emery, L., Kalapothakis, E., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chavez-Olortegui, C., 2010. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. Toxicon 55, 481–487.
Dias-Lopes, C., Felicori, L., Rubrecht, L., Cobo, S., Molina, L., Nguyen, C., Galéa, P., Granier, C., Molina, F., Chávez-Olortegui, C., 2014. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from Loxosceles spider venoms. Vaccine 32 (18), 2086–2092.
Duarte, C.G., Bonilla, C., Guimarães, G., Machado de Avila, R.A., Mendes, T.M., Silva, W., Tintaya, B., Yarleque, A., Chávez-Olórtegui, C., 2015. Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant dermonecrotic protein of Brazilian Loxosceles intermedia spider neutralize lethal effects of Loxosceles laeta venom from Peru. Toxicon 93, 37–40.
Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S., Boger, J., 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J. Virol. 55 (3), 836–839.
Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. Toxicon 36, 1039–1051.
Felicori, L., Araujo, S.C., de Avila, R.A., Sanchez, E.F., Granier, C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2006. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from Loxosceles intermedia spider. Toxicon 48 (5), 509–519.
Felicori, L., Fernandes, P.B., Giusta, M.S., Duarte, C.G., Kalapothakis, E., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chavez-Olortegui, C., 2009. An *in vivo* protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. Vaccine 27, 4201–4208.
Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Kobashi, L.S., Almeida, D.D., Ho, P.L., Tambourgi, D.V., 2008. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. BMC Genomics 9, 279.
Ferrer, V.P., de Mari, T.L., Gremski, L.H., Trevisan-Silva, D., da Silveira, R.B., Gremski, W., Chaim, O.M., Senff-Ribeiro, A., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2013. A novel hyaluronidase from brown spider (Loxosceles intermedia) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. PLoS Negl. Trop. Dis. 7 (5), e2206. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002206.
Figueiredo, L.F., Dias-Lopes, C., Alvarenga, L.M., Mendes, T.M., Machado-de-Ávila, R.A., McCormack, J., Minozzo, J.C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2014. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. Toxicon 86, 59–67.
Futrell, J.M., 1992. Loxoscelism. Am. J. Med. Sci. 304, 261–267.
Girish, K.S., Kemparaju, K., 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. Life Sci. 80, 1921–1943.
Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Probst, C.M., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. Mol. Biosyst. 6, 2403–2416.
Gremski, L.H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Meissner, G.O., Wille, A.C., Vuitika, L., Dias-Lopes, C., Ulla, H.A., de Moraes, F.R., Chávez-Olórtegui, C., Barbaro, K.C., Murakami, M.T., Arni, R.K., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2014. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. Toxicon 83, 91–120.
Guilherme, P., Fernandes, I., Barbaro, K.C., 2001. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important Loxosceles spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. Toxicon 39 (9), 1333–1342.
Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K., 2004 Dec. Loxoscelism: old obstacles, new directions. Ann. Emerg. Med. 44 (6), 608–624.
Kalapothakis, E., Araujo, S.C., de Castro, C.S., Mendes, T.M., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert, I.C., Chávez-Olórtegui, C., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of Loxosceles intermedia spider venom. Toxicon 40 (12), 1691–1699.
Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Goncalves-Dornelas, H., de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Laborne, F.V., de Moura, J.F., Veiga, S.S., Chavez-Olortegui, C., Granier, C., Barbaro, K.C., 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. Toxicon 50, 938–946.
Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Lett. 276 (1–2), 172–174.
Larsen, J.E.P., Lund, O., Nielsen, M., 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res. 2, 2.
Luciano, M.N., da Silva, P.H., Chaim, O.M., dos Santos, V.L., Franco, C.R., Soares, M.F., Zanata, S.M., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. J. Histochem Cytochem 52, 455–467.
Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M.V., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. Proteomics 5, 2167–2176.
Matsubara, F.H., Gremski, L.H., Meissner, G.O., Soares, E.C.L., Gremski, W., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2013. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. Toxicon 71, 147–178.
Mendes, T.M., Oliveira, D., Figueiredo, L.F., Machado-de-Avila, R.A., Duarte, C.G., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Minozzo, J.C., Chávez-Olortegui, C., 2013. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. Vaccine 31, 2749–2755.
Pauli, I., Minozzo, J.C., da Silva, P.H., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2009. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). Toxicon 53 (6), 660–671.
Ponomarenko, J., Bui, H.H., Li, W., Fusseder, N., Bourne, P.E., Sette, A., Peters, B., 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. BMC Bioinforma. 9, 514.
Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solis, J., Alagon, A., Stock, R.P., 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. Toxicon 44, 507–514.
Ramada, J.S., Becker-Finco, A., Minozzo, J.C., Felicori, L.F., Machado de Avila, R.A., Molina, F., Nguyen, C., de Moura, J., Chávez-Olórtegui, C., Alvarenga, L.M., 2013.

Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of Loxosceles antivenoms. Toxicon 73, 47–55.
Ribeiro, R.O., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Sade, Y.B., Paludo, K.S., SenffRibeiro, A., de Moura, J., Chavez-Olortegui, C., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Toxicon 50, 1162–1174.
Sade, Y.B., Bóia-Ferreira, M., Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2012. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 170–177.
Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. Biotechnol. Adv. 26, 210–218.
Swanson, D.L., Vetter, R.S., 2006. Loxoscelism. Clin. Dermatol. 24, 213–221.
Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Meissner, G.O., Mangili, O.C., Barbaro, K.C., Gremski, W., Veiga, S.S., Senff-Ribeiro, A., 2010. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). Biochimie 92, 21–32.
Trevisan-Silva, D., Bednaski, A.V., Gremski, L.H., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Senff-Ribeiro, A., 2013. Differential metalloprotease content and activity of three Loxosceles spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. Toxicon 76, 11–22.
Tuynder, M., Fiucci, G., Prieur, S., Lespagnol, A., Geant, A., Beaucourt, S., Duflaut, D., Besse, S., Susini, L., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., Telerman, A., 2004. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 15364–15369.
Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Dreyfus, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W., 2000. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Toxicon 38, 825–839.
Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Braz, A., Mangili, O.C., Gremski, W., 2001a. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. Braz. J. Med. Biol. Res. 34, 843–850.
Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Franco, C.R., Trindade, E.S., Porcionatto, M.A., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., 2001b. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. Thromb. Res. 102, 229–237.
Wille, A.C.M., Chaves-Moreira, D., Silva, D.T., Magnoni, M.G., Ferreira, M.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Chaim, O.M., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2013. 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 67, 17–30.
Young, A.R., Pincus, S.J., 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens, Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. Toxicon 39, 391–400.