

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA RIBEIRO

ASPECTOS MOLECULARES E CELULARES DE QUERATINÓCITOS E
FIBROBLASTOS *IN VITRO* INDUZIDOS POR VENENO E FOSFOLIPASES-D
RECOMBINANTES DE ARANHA-MARROM

CURITIBA

2019

VANESSA RIBEIRO

ASPECTOS MOLECULARES E CELULARES DE QUERATINÓCITOS E
FIBROBLASTOS *IN VITRO* INDUZIDOS POR VENENO E FOSFOLIPASES-D
RECOMBINANTES DE ARANHA-MARROM

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutora em
Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Olga Meiri Chaim

Co orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2019

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ribeiro, Vanessa.

Aspectos moleculares e celulares de queratinócitos e fibroblastos in vitro induzidos por veneno e fosfolipases-D recombinantes de aranha-marrom. / Vanessa Ribeiro. – Curitiba, 2019.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Olga Meiri Chaim.

Coorientador: Dra. Silvio Sanches Veiga.

1. Loxosceles. 2. Fosfolipases. 3. Queratinócitos. 4. Fibroblasto. 5. Citotoxicidade de mediação celular. 6. Necrose. 7. Aranha-marrom. I. Chaim, Olga Meiri, 1980-. II. Veiga, Silvio Sanches, 1962-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

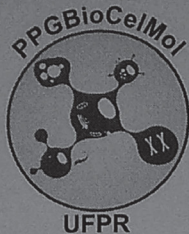
Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que a discente **Vanessa Ribeiro**, após a defesa de seu doutorado, e antes da solicitação de diploma, teve seu nome alterado de Vanessa Ribeiro Heidemann para Vanessa Ribeiro.

Curitiba, 05 de agosto de 2024.

Lucas Carvalho de Menezes
Administrador - Secretário do Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Matr. / UFPR 206028



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **VANESSA RIBEIRO HEIDEMANN** intitulada **“ASPECTOS MOLECULARES E CELULARES DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS IN VITRO INDUZIDOS POR VENENO E FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE ARANHA-MARROM”**, sob orientação da Profa. Dra. OLGA MEIRI CHAIM, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APPROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 14 de Agosto de 2019.

OLGA MEIRI CHAIM
Presidente da Banca examinadora

KÁTIA SABRINA PALUDO
Avaliador Externo (UEPG)

PATRICIA SHIGUNOV
Avaliador Externo (ICC)

FRANCISCO FILIPAK NETO
Avaliador Interno (UFPR)

SILVO MARQUES ZANATA
Avaliador Interno (UFPR)



Dedico este trabalho aos meus pais, Alcir Sebastião Ribeiro e Maria de Fátima da Cruz Ribeiro, que sempre fizeram tanto por mim e, principalmente, me apoiam incondicionalmente na minha contínua busca pelo conhecimento, tanto científico quanto pessoal.

Dedico este trabalho à minha irmã, Talita Ribeiro, minha melhor amiga e uma grande incentivadora.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº Processo 23075.074706/2022-53 aprovado pelo colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pelo acesso a ótimos professores que foram capazes de dividir seus conhecimentos, além de guiar no processo de desenvolvimento da carreira acadêmica.

Ao professor Silvio Sanches Veiga, meu agradecimento por permitir que eu utilizasse toda estrutura do seu laboratório (LME); agradeço por todo investimento feito em materiais e reagentes, confiando que os resultados obtidos neste trabalho poderiam contribuir com o crescimento do grupo e principalmente da ciência. Gostaria de agradecer ainda pela coorientação e toda contribuição científica/intelectual realizada.

À minha orientadora, Dra. Olga Meiri Chaim, um eterno agradecimento por toda a sua contribuição para o meu crescimento profissional. Obrigada pelas lições e debates científicos, pelas ricas ideias, inspirações e pelo apoio às minhas iniciativas científicas. Sua orientação me guiou pelo melhor caminho e me fez pensar além do óbvio. Agradeço pela confiança e pelas oportunidades de integração com outros grupos de pesquisa e pela apresentação de nosso trabalho em congressos de impacto, inclusive no exterior.

Agradeço às professoras que fazem parte do LME, Dra. Andrea Senff-Ribeiro e à Dra. Luiza Gremski, pelo apoio.

Durante a execução deste trabalho tive a oportunidade de realizar parte dos ensaios em colaboração com pesquisadores do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Gostaria de expressar minha profunda gratidão à professora Dra. Helena Nader, uma mulher forte, exemplo de cidadania e cultura. Um ser humano ímpar. Agradeço imensamente por me permitir desenvolver meu trabalho junto ao seu grupo de pesquisa e por usufruir da estrutura de seu laboratório.

Também sou grata ao professor Dr. Marcelo Lima por suas valiosas contribuições científicas, tanto intelectuais quanto práticas, durante os períodos de colaboração.

Agradeço ainda aos colegas de bancada e pelas discussões científicas extremamente enriquecedoras: Dr. Renan P. Cavalheiro, Dr. Gustavo Viana e Dra. Maria Cecília Meneghetti. Os momentos que compartilhei com vocês foram inspiradores e motivadores.

À minha amiga Paula Deboni, com quem iniciei uma amizade nas bancadas da UFPR, que continuou até as bancadas da Unifesp, até os dias atuais. Agradeço por todo o companheirismo, pelos inúmeros experimentos realizados juntas, pelos artigos discutidos, pelos risos e choros compartilhados. Agradeço por sua amizade.

Um agradecimento especial aos meus amigos Adriano Morgon e Gabriel Meissner, que conheci no LME (UFPR). Compartilhamos juntos as dificuldades na bancada, sempre oferecendo suporte uns aos outros.

Quero agradecer a todos os colegas do LME que contribuíram no dia a dia para o desenvolvimento de meu trabalho: Thaís Silva, Nyanne Poli, Zelinda Schemczssen, Bruno Antunes, Pedro Schluga, Antonielle Baldissera, Marianna Boia, Elidiana De Bona, Hanna Justa e todos os alunos de Iniciação Científica que passaram ao longo deste tempo, meu muito obrigada, sem vocês esse trabalho seria ainda mais difícil. Desejo sucesso pessoal e profissional a todos.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

RESUMO

As aranhas-marrons do gênero *Loxosceles* são aracnídeos cosmopolitas com presença confirmada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. A alta incidência de acidentes por picadas de *Loxosceles* torna o envenenamento um importante problema de saúde pública. Os sintomas mais comuns incluem lesões necróticas no local da picada, ocasionalmente acompanhadas por manifestações sistêmicas como febre, hemólise, trombocitopenia e insuficiência renal aguda. O veneno das *Loxosceles* é uma complexa mistura de moléculas bioativas, destacando-se enzimas como proteases, hialuronidases e fosfolipases-D (PLD). As PLD, conhecidas por suas propriedades dermonecroticas, desempenham um papel crucial na indução da resposta inflamatória local exacerbada e na necrose tecidual. Estudos recentes focaram em identificar os alvos moleculares e celulares das PLD, evidenciando que a ação dessas toxinas pode variar significativamente dependendo do tipo celular e da composição lipídica da membrana. Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT) e fibroblastos humanos (HFF-1) para investigar os efeitos do veneno total de *Loxosceles intermedia* e das PLD recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. As análises morfológicas detalhadas revelaram diferenças marcantes nas respostas celulares, associadas à composição lipídica da membrana e ao metabolismo celular específico de cada linhagem. Além disso, foram realizadas análises abrangentes de viabilidade celular, citotoxicidade, morte celular, proliferação celular e efeitos das PLD nas propriedades da membrana celular, empregando métodos avançados de preparo de amostras para análise molecular. Os resultados revelam que as diferenças na composição lipídica da membrana celular desempenham um papel fundamental nas respostas celulares ao veneno e às PLD de *Loxosceles intermedia*. Isso destaca a necessidade de investigações adicionais sobre metabólitos secundários liberados e seu potencial impacto na comunicação celular e na regulação da resposta inflamatória. Essas descobertas contribuem significativamente para o entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos do veneno de *Loxosceles* em nível celular, transcendendo a simples atividade enzimática direta, e podem orientar investigações futuras e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Palavras-chave: loxoscelismo; fosfolipases-D; queratinócitos; fibroblastos; citotoxicidade; dermonecrose.

ABSTRACT

Brown spiders of the *Loxosceles* genus are cosmopolitan arachnids present in the Southern and Southeast regions of Brazil. A high rate of *Loxosceles* spider bites induce envenomation which became a significant public health issue worldwide. Frequent symptoms include necrotic lesions at the bite site, occasionally accompanied by systemic manifestations such as fever, hemolysis, thrombocytopenia, and acute renal failure. *Loxosceles* sp. venom is a complex mixture of bioactive molecules, with enzymes including a variety of proteases, hyaluronidases, and phospholipases-D (PLD) specially being prominent. PLDs, known for their dermonecrotic properties, play a crucial role in inducing an exacerbated local inflammatory response and tissue necrosis. Recent studies have focused on identifying the molecular and cellular targets of PLDs, highlighting that action of these toxins can vary significantly depending on cell type and lipid membrane composition. On this Thesis, human keratinocytes (HaCaT) and human fibroblasts (HFF-1) were used to investigate effects of whole crude venom from *Loxosceles intermedia* (total venom) and recombinant PLDs isoforms LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A. Detailed morphological findings revealed striking differences in cellular responses to venom toxins. Changes on membrane lipid composition and metabolism of each cell line depicted loss of cell spreading and detachment of rounded shaped cells or debris developed from cytoplasmic retraction noticeable by refringent contrast with nuclear areas on elongated cells. Furthermore, comprehensive analyses of cell viability and proliferation, were approached by cell-based-assays to measure cytotoxic effects and cell death by PLDs. PLD activity upon cell membranes evaluated using organic-enriched extracts solubilized for spectrometric and chromatographic tests indicated differences in PLD affinity and ability to act upon the different components. In fact, even the mutated isoform, which has less intense phospholipase activity, still induced mild changes like previously observed in endothelial cells or in animal models by *Loxosceles* venoms. The release of secondary metabolites by membrane disturbances have an impact on cellular communication through regulation of major recruitment of immune cells to the bite site. Skin cell membranes hydrolyzed turned into bioactive lipids signals throughout the dermis structures. Molecular mechanisms underlying the activation of multiple pathways subjected to effects of *Loxosceles* venom at the cellular level, with regards to those mediated by lipids, goes beyond simple direct enzymatic activity, therefore, it request a deeper assessment of cytotoxic effects of toxins to guide future researches for effective development on therapeutic strategies.

Keywords: loxoscelism; phospholipase-D; keratinocyte; fibroblast; cytotoxicity; dermonecrosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	29
FIGURA 2. LESÕES CUTÂNEAS NO LOXOSCELISMO.	30
FIGURA 3. ACENTUAÇÃO DOS SINTOMAS DO LOXOSCELISMO NAS PRIMEIRAS HORAS.....	32
FIGURA 4. PROPORÇÕES RELATIVAS DE CADA GRUPO DE TOXINAS SOBRE O TOTAL TRANSCRITOS CODIFICADORES DE TOXINAS.....	34
FIGURA 5. MODELAGEM MOLECULAR DE LIRECDT1 E LIRECDT7.	36
FIGURA 6. LESÃO DERMONECRÓTICA, SEM PROGRESSÃO PARA NECROSE.....	41
FIGURA 7. ANÁLISE POR SDS/PAGE 15% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS EXPRESSÕES DA LIRECDT1 E LIRECDT1 H12A EM MEIO LB LÍQUIDO A 30°C UTILIZANDO A CEPA DE <i>E. COLI</i> BL21(DE3)PLYSS.....	63
FIGURA 8. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) NO TEMPO 0 HORA.....	70
FIGURA 9. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS 2 HORAS DE INCUBAÇÃO.	71
FIGURA 10. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS 4 HORAS DE INCUBAÇÃO.	72
FIGURA 11. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.	73
FIGURA 12. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) NO TEMPO 0 HORA.	74
FIGURA 13. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) APÓS 4 HORAS DE INCUBAÇÃO.	75
FIGURA 14. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) APÓS 8 HORAS DE INCUBAÇÃO.	76

FIGURA 15. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DAS TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.	77
FIGURA 16. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> DE EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR DE ENDOTÉLIO DE AORTA DE COELHO (RAEC).	83
FIGURA 17. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> DE ISOLAMENTO DE MEMBRANA RESISTENTE À DETERGENTE (BALSAS LIPÍDICAS) POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE SACAROSE. ...	85
FIGURA 18. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> DE EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT).	86
FIGURA 19. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> DE EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT).	86
FIGURA 20. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE <i>WESTERN BLOTTING</i> DE EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT).	87
FIGURA 21. LIGAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT1-GFP À MEMBRANA CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1).	89
FIGURA 22. LIGAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT1-GFP À MEMBRANA CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1).	90
FIGURA 23. LIGAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT1-GFP À MEMBRANA CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1).	91
FIGURA 24. INTERNALIZAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT1-GFP EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1).	93
FIGURA 25. LIGAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT1-GFP À MEMBRANA CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1).	94
FIGURA 26. LIGAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT1-GFP À MEMBRANA CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1).	95
FIGURA 27. CONTROLES DO ENSAIO DE MORTE CELULAR EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT).	99

FIGURA 28. ENSAIO DE MORTE CELULAR EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) INCUBADOS COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES.	100
FIGURA 29. CONTROLES DO ENSAIO DE MORTE CELULAR EM FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1).	105
FIGURA 30. ENSAIO DE MORTE CELULAR EM FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) INCUBADOS COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES.	105
FIGURA 31. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA ANALISADA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTO DESEMPENHO EM FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) E QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) INCUBADOS COM TOXINA RECOMBINANTE POR 1 HORA E 2 HORAS.	108
FIGURA 32. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE WESTERN BLOTTING DE LISSOSSOMOS ISOLADOS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO (RAEC).	110
FIGURA 33. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE WESTERN BLOTTING DE LISSOSSOMOS ISOLADOS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO (RAEC).	110
FIGURA 34. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE WESTERN BLOTTING DE LISSOSSOMOS ISOLADOS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO (RAEC).	111
FIGURA 35. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE WESTERN BLOTTING DE LISSOSSOMOS ISOLADOS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO (RAEC).	111
FIGURA 36. ANÁLISE REPRESENTATIVA DE WESTERN BLOTTING DE LISSOSSOMOS ISOLADOS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO (RAEC).	112
FIGURA 37. ANÁLISE DE AUTOFAGIA NA LINHAGEM DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO (RAEC) INCUBADAS COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES POR 6 HORAS.	114

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. ENSAIO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES.....	65
GRÁFICO 2. NÍVEIS DE ATP LIBERADOS POR QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES, NOS TEMPOS 0 HORA, 1 HORA, 4 HORAS, 8 HORAS E 24 HORAS.....	66
GRÁFICO 3. NÍVEIS DE ATP LIBERADOS PELOS QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES NOS TEMPOS DE 0 HORA, 1 HORA, 4 HORAS, 8 HORAS E 24 HORAS.....	68
GRÁFICO 4. NÍVEIS DE VERMELHO NEUTRO INTERNALIZADO POR QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES, NOS TEMPOS 0 HORA, 1 HORA, 2 HORAS, 4 HORAS, 6 HORAS, 8 HORAS E 24 HORAS.....	78
GRÁFICO 5. NÍVEIS DE DESIDROGENASE MITOCONDRIAL EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES, NOS TEMPOS DE 0 HORA, 1 HORA, 2 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS, UTILIZANDO O ENSAIO DE MTT.	80
GRÁFICO 6. NÍVEIS DE DESIDROGENASE MITOCONDRIAL EM FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES, NOS TEMPOS DE 0 HORA, 1 HORA, 2 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS, UTILIZANDO O ENSAIO DE MTT.....	81
GRÁFICO 7. NÍVEIS DE CITOTOXICIDADE CELULAR EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES, UTILIZANDO O CORANTE CRISTAL VIOLETA.....	82
GRÁFICO 8. ANÁLISE DE MORTE CELULAR EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES, UTILIZANDO A PROTEÍNA ANEXINA-V CONJUGADA COM FITC, NOS TEMPOS DE 1 HORA, 4 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS.	96
GRÁFICO 9. ANÁLISE DE MORTE CELULAR EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E TOXINAS RECOMBINANTES, UTILIZANDO O FLUOROCROMO 7-AAD, NOS TEMPOS DE 1 HORA, 4 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS.....	97
GRÁFICO 10. ANÁLISE DE MORTE CELULAR EM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E	

TOXINAS RECOMBINANTES), UTILIZANDO MARCAÇÃO POR ANEXINA-V E 7-AAD, NOS TEMPOS DE 1 HORA, 4 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS.....98

GRÁFICO 11. ANÁLISE DE MORTE CELULAR EM FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* E TOXINAS RECOMBINANTES, UTILIZANDO ANEXINA-V CONJUGADA COM FITC, NOS TEMPOS DE 1 HORA, 6 HORAS E 24 HORAS. 102

GRÁFICO 12. ANÁLISE DE MORTE CELULAR EM FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* E TOXINAS RECOMBINANTES, UTILIZANDO O FLUOROCROMO 7-AAD, NOS TEMPOS DE 1 HORA, 6 HORAS E 24 HORAS. 103

GRÁFICO 13. ANÁLISE DE MORTE CELULAR EM FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* E TOXINAS RECOMBINANTES, COM MARCAÇÃO POR ANEXINA-V E 7-AAD, NOS TEMPOS DE 1 HORA, 6 HORAS E 24 HORAS. 104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS UTILIZANDO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E LIRECDT1 UTILIZANDO LINHAGENS DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS HUMANOS.	129
TABELA 2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS COMPARAÇÕES TEMPORAIS E DE TRATAMENTO DOS NÍVEIS DE ATP LIBERADOS PELOS QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> 25 MG/ML E TOXINAS RECOMBINANTES 25 MG/ML NOS TEMPOS 0 HORA, 1 HORA, 4 HORAS, 8 HORAS E 24 HORAS.	144
TABELA 3. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS COMPARAÇÕES TEMPORAIS E DE TRATAMENTO DOS NÍVEIS DE ATP LIBERADOS PELOS QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> 25 MG/ML E TOXINAS RECOMBINANTES 25 MG/ML NOS TEMPOS 0 HORA, 1 HORA, 4 HORA, 8 HORA E 24 HORAS.	145
TABELA 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS COMPARAÇÕES TEMPORAIS E DE TRATAMENTO DOS NÍVEIS DE VERMELHO NEUTRO INTERNALIZADO POR QUERATINÓCITOS HUMANOS APÓS INCUBAÇÃO COM VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> 25 MG/ML E TOXINAS RECOMBINANTES 25 MG/ML, NOS TEMPOS 0 HORA, 1 HORA, 2 HORAS, 4 HORAS, 6 HORAS, 8 HORAS E 24 HORAS.	146
TABELA 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS COMPARAÇÕES TEMPORAIS E DE TRATAMENTO DA ATIVIDADE DA DESIDROGENASE MITOCONDRIAL NA LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> 25 MG/ML E TOXINAS RECOMBINANTES 25 MG/ML NOS TEMPOS DE 0 HORA, 1 HORA, 2 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS.....	146
TABELA 6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS COMPARAÇÕES TEMPORAIS E DE TRATAMENTO DA ATIVIDADE DA DESIDROGENASE MITOCONDRIAL NA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HFF-1) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> 25 MG/ML E TOXINAS RECOMBINANTES 25 MG/ML, NOS TEMPOS DE 0 HORA, 1 HORA, 2 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS.....	147
TABELA 7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS COMPARAÇÕES TEMPORAIS E DE TRATAMENTO DA ANÁLISE DE MORTE CELULAR NA LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) INDUZIDA PELO VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> 25 MG/ML E TOXINAS RECOMBINANTES 25 MG/ML, INDICANDO MARCAÇÃO COM ANEXINA-V E 7-AAD, NOS TEMPOS DE 1 HORA, 4 HORAS, 6 HORAS, 16 HORAS E 24 HORAS.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-amino actinomicina
APS	Persulfato de Amônio
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt</i>
BSA	do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>
C1P	Ceramida-1-fosfato
CERK	Ceramida-Quinase
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
CXCL2	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>
DAMP	do inglês: <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DMEM	do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DRM	do inglês: <i>Detergent Resistant Membrane</i>
EBSS	do inglês: <i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ERK1/2	do inglês: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FL	do inglês: <i>Fluorescence levels</i>
GFP	do inglês: <i>Green Fluorescent Protein</i>
HBSS	do inglês: <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCQ	Hidroxicloroquina
HM	Meio de homogeneização
HMGB1	do inglês: <i>High mobility group protein B1</i>
HPTLC	do inglês: <i>High-performance thin-layer chromatography</i>
I	Litro
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IPTG	β -D-thiogalactopiranosídeo
LAMP-1	do inglês: <i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LAMP-2	do inglês: <i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>

LiRecDT1	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 1</i>
LiRecDT2	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 2</i>
LiRecDT3	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 3</i>
LiRecDT4	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 4</i>
LiRecDT5	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 5</i>
LiRecDT6	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 6</i>
LiRecDT7	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 7</i>
LiRecDT1 H12A	<i>Loxosceles intermedia Recombinant D Toxin 1 H12A</i>
LiTx	<i>Knottins/Similar to insecticidal toxins of L. intermedia</i>
LoxTox	do inglês: <i>Loxosceles toxin</i>
LPA	do inglês: <i>Lysophosphatidic acid</i>
LPC	Lisofosfatidilcolina
M	Molaridade
mA	Miliampere
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium chloride</i>
NCCD	<i>Nomenclature Committee on Cell Death</i>
nm	Nanômetro
NP40	Nonidet P-40 (detergente não-iônico)
PAF	Fator ativador de plaquetas
PA	Ácido fosfatídico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfoetanolamina
PGE2	Prostaglandina E2
PLD	Fosfolipases-D
PI	Fosfatidilinositol

PS	Fosfatidilserina
psi	do inglês: <i>pounds per square inch</i> - libra por polegada quadrada.
RAEC	do inglês: <i>Rabbit Aortic Endothelial Cells</i>
RFP	do inglês: <i>Red Fluorescent Protein</i>
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SMase-D	Esfingomielinases-D
SM	Esfingomielina
TBST	do inglês: <i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TCA	Tricloroacético
TCTP	do inglês: <i>Translationally controlled tumor protein</i>
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFR1	Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1
TPP	do inglês: <i>Techno Plastic Products Switzerland</i>
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta
V	Voltz
VN	Vermelho Neutro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	JUSTIFICATIVA.....	26
1.2	OBJETIVOS	27
1.2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1	ARANHAS E LOXOSCELISMO	28
2.2	VENENO LOXOSCÉLICO	33
2.3	FOSFOLIPASES-D LOXOSCÉLICAS	35
2.4	AÇÃO DAS FOSFOLIPASES-D E SEUS METABÓLITOS.....	37
2.5	QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS NO CONTEXTO DO ENVENENAMENTO.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	EXTRAÇÃO DE VENENO TOTAL DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	43
3.2	TRANSFORMAÇÕES DAS CONSTRUÇÕES EM CEPA BACTERIANA ...	43
3.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	44
3.4	EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> POR SDS-PAGE	44
3.5	DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD	45
3.6	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	46
3.7	CULTIVOS CELULARES	46
3.8	EXCLUSÃO CELULAR COM CORANTE AZUL DE TRIPAN.....	48
3.9	EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR.....	49
3.10	PRECIPITAÇÃO PROTEICA EM AMOSTRAS CELULARES	49
3.11	DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ÁCIDO BICINCONÍNICO	50
3.12	VIABILIDADE CELULAR POR QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP....	50
3.13	MORFOLOGIA CELULAR AVALIADA POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE.....	51
3.14	VIABILIDADE CELULAR POR CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO.....	52
3.15	CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT	53
3.16	CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA.....	54

3.17	FRACIONAMENTO DE MEMBRANA CELULAR RESISTENTE À DETERGENTE (BALSAS LIPÍDICAS)	55
3.18	IMUNODETECÇÃO POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	55
3.19	IMUNODETECÇÃO DE FOSFOLIPASE-D POR MICROSCOPIA CONFOCAL	57
3.20	MORTE CELULAR ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	58
3.21	MEMBRANA CELULAR AVALIADA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTO DESEMPENHO	59
3.22	PROCESSO AUTOFAGICO AVALIADO POR MICROSCOPIA CONFOCAL 60	
3.23	ISOLAMENTO DE LISSOSSOMOS POR CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL E GRADIENTE DE DENSIDADE	61
3.24	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	62
4	RESULTADOS	63
4.1	ANÁLISE DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	63
4.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES	64
4.3	VIABILIDADE CELULAR POR QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP....	65
4.4	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS HUMANOS POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE ...	69
4.5	ANÁLISE DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO POR QUERATINÓCITOS HUMANOS	78
4.6	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT	79
4.7	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA	81
4.8	REAÇÃO DE <i>IMUNOBLOTTING</i> PARA ANÁLISE DE EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR	83
4.9	REAÇÕES DE <i>IMUNOBLOTTING</i> PARA DETECÇÃO DE MEMBRANA RESISTENTE À DETERGENTE (BALSAS LIPÍDICAS)	83
4.10	ANÁLISE CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS POR IMAGEM ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL	87
4.11	ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE MORTE CELULAR.....	96

4.12	ANÁLISE DE MEMBRANA CELULAR DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS HUMANOS POR CROMATOGRAPHIA EM CAMADA DELGADA DE ALTO DESEMPENHO	107
4.13	REAÇÃO DE <i>IMUNOBLOTTING</i> PARA ANÁLISE DE ISOLAMENTO DE LISOSSOMOS	109
4.14	AVALIAÇÃO DE AUTOFAGIA EM CÉLULA ENDOTELIAL DE AORTA DE COELHO POR IMAGEM ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL	113
5	DISCUSSÃO	115
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
6.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	129
	REFERÊNCIAS.....	131
	ANEXO I - DESCRIÇÃO ESTATÍSTICA.....	144
	ANEXO II - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO	148
	ANEXO III - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO	151
	ANEXO IV - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO	153
	ANEXO V - ARTIGO PUBLICADO	155

1 INTRODUÇÃO

A área de toxinologia tem utilizado aranhas com venenos que apresentam alta severidade e toxicidade no envenenamento (Nguyen; Pandey, 2019; Trevisan-Silva et al., 2017). As aranhas do gênero *Loxosceles* são cosmopolitas, estando distribuídas em regiões temperadas e em regiões tropicais com altas taxas de acidentes em diferentes países (Platnick; Raven, 2013). Após a picada, com baixo volume de veneno inoculado (Calabria et al., 2019), o processo de envenenamento desenvolve sintomas cutâneos e sistêmicos denominados loxoscelismo, podendo estes sintomas ocorrer simultaneamente ou não (Nguyen; Pandey, 2019). A lesão cutânea apresenta dano dermonecrótico, com propagação gravitacional, formação da placa marmórea, caracterizada por uma área de tecido isquêmico circundada por um halo vermelho e áreas pálidas (Chatzaki et al., 2012; Chaves-Moreira et al., 2017). Os sintomas sistêmicos incluem níveis elevados de bilirrubina, distúrbios hematológicos como hemólise intravascular e anemia hemolítica, além de insuficiência renal aguda, que podem resultar em morte (Chaim et al., 2006; Chaves-Moreira et al., 2011; Malaque et al., 2011).

A composição do veneno inclui moléculas bioativas com diferentes funções e ação sinérgica, estudadas para serem melhor compreendidas e potencialmente utilizadas em aplicações tecnológicas. Entre os componentes identificados estão proteases, hialuronidases, fosfolipases, peptidases, collagenases, fosfatases alcalinas, 5'-ribonucleotidases, fosfohidrolases e toxinas inseticidas, todos avaliados bioquímica e biologicamente. Existem três classes principais de "moléculas altamente expressas" que constituem aproximadamente 95% dos transcritos codificadores de toxinas na glândula de veneno: fosfolipases-D (PLD), proteases do tipo astacina e peptídeos de baixa massa molecular bioquimicamente caracterizados como *Knottins* (peptídeos ICK) (Dantas et al., 2016; Gremski et al., 2010; Medina-Santos et al., 2022; Trevisan-Silva et al., 2017).

É sabido que a disseminação do veneno nos tecidos se dá pela ação das hialuronidases, concomitantemente outras toxinas agem sobre matriz e membrana celular e muitas moléculas são internalizadas pelas células, causando uma resposta inflamatória massiva local e ação sistêmica (Nowatzki et al., 2012; Rojas et al., 2017). As PLD são as enzimas mais descritas no veneno do gênero *Loxosceles*, são

conhecidas por toxinas dermonecróticas e por si só são capazes de desenvolver a lesão dermonecrótica (Chaim et al., 2011; Nguyen; Pandey, 2019).

Em mamíferos esta família de enzimas é regulada por GTPases, quinases e fosfoinosítídeos, pois a PLD intracelular se conecta aos receptores acoplados à proteína G (GPCR), ativa as vias MAPK ou ERK1/2 e promove a estimulação de mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas, mitógenos e porções pró-angiogênicas (Brandenburg; Pufe; Koch, 2014; Stoddard; Chun, 2015), porém o processo de sinalização das PLD de aranhas não está descrito. Estudos sobre mecanismos celulares e moleculares demonstraram que a ação da PLD de aranha marrom induz a liberação de citocinas inflamatórias, como CXCL1, CXCL2, IL-6 e IL-8 (Rojas et al., 2017).

Enzimaticamente, as PLD atuam sobre fosfolipídios de membrana como esfingomielina (SM), lisofosfatidilcolina (LPC), além de lisofosfolipídeos como, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico e fosfatase ácida; em menor quantidade, atua sobre fator ativador de plaquetas (PAF) (Fukuda et al., 2017). Em condições específicas a ação da PLD resulta na liberação de produtos secundários como a colina, ácido fosfatídico (PA), ceramida 1-fosfato (C1P) e ácido lisofosfatídico (LPA) (Dantas et al., 2016; Maceyka; Spiegel, 2014; Rivera et al., 2015).

Pelo fato de a família das PLD terem atuação protagonista no envenenamento e estas já estarem bem descritas, diversos pesquisadores as têm utilizado como alvo para novos ou diferentes tratamentos no processo de envenenamento pela picada da aranha marrom (Calabria et al., 2019; Karim-Silva et al., 2016; Rivera et al., 2015; Rojas et al., 2017). Resultados utilizando frações de anticorpos produzidos a partir de antígenos de PLD mostraram eficiência na neutralização da ação dessas PLD e na hemólise durante o envenenamento (Calabria et al., 2019; Karim-Silva et al., 2016). Ainda na busca pela inibição da ação das PLD, foram utilizados inibidores de PLD, pertencentes à classe dos compostos orgânicos de benzeno sulfonato, capazes de suprimir reações locais e sistêmicas induzidas pelos venenos de *Loxosceles* (Lopes et al., 2019).

Estudos do nosso grupo com foco em resposta inflamatória causada por veneno total de *L. intermedia* e pela ação exclusiva das PLD, em diferentes linhagens celulares, já vem acumulando uma gama de conhecimento na ação enzimática e no mecanismo celular, conforme citado em todo texto. Esse trabalho focou em linhagens humanas de queratinócitos e fibroblastos, que compõem o tecido epitelial, alvo inicial

durante o processo de envenenamento de animais (Nowatzki et al., 2012). A partir de dados de citotoxicidade, a busca por alvos moleculares envolvidos no processo de liberação de marcadores inflamatórios foi considerada interessante para analisar qual o tempo necessário de ação das PLD sobre as células e se estas ativam um processo inflamatório autossustentado (Rojas et al., 2017).

Pelas PLD atuarem intensamente no contexto inflamatório no processo do envenenamento e, devido ao fato de que a inflamação possa ser sustentada horas após a picada, desencadeando morte celular irreversível, ambas linhagens foram analisadas individualmente para melhor entendimento da resposta celular das primeiras camadas da epiderme.

1.1 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o veneno loxoscélico é composto por peptídeos e proteínas de ações tóxicas e/ou enzimáticas (Gremski et al., 2014). Dentre os componentes do veneno as toxinas mais bem descritas pela literatura são as PLD (Chaim et al., 2011), que estudos com o uso de técnicas de biologia molecular e celular, identificaram várias isoformas e mecanismos de atuação destas toxinas dermonecróticas estabelecendo suas ações moleculares e biológicas (Chaim et al., 2006, 2011; Chaves-Moreira et al., 2011; Lee; Lynch, 2005). Estes estudos permitiram inclusive a expressão e purificação de diversas isoformas recombinantes, como as isoformas utilizadas neste trabalho: LiRecDT1 e a isoforma com mutação sítio dirigida, LiRecDT1 H12A. Tais modificações na estrutura da proteína proporcionaram um melhor entendimento do papel da atividade enzimática e interação com os diferentes alvos/substratos celulares (Chaim et al., 2011b; Malaque et al., 2011).

Estas enzimas sozinhas são capazes de desenvolver a lesão dermonecrótica (Chaim et al., 2011b), sinalizando para o desencadeamento do processo inflamatório. Na reação inflamatória pós-picada da aranha-marrom, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios endógenos, que promovem o aparecimento da lesão dermonecrótica resultante de uma necrose coagulativa asséptica, ou seja, de uma maciça infiltração leucocitária (Barbaro et al., 2010; Chaim et al., 2011b; Nowatzki et al., 2010, 2012). Entretanto, ainda há muito o que se compreender quando se trata do processo inflamatório que ocorre tanto no local da picada, a pele, quanto em nível sistêmico naqueles acidentados loxoscélicos, uma vez que a amplificação desse sinal é muito rápida e depende de ínfimas quantidades de veneno (Nguyen; Pandey, 2019).

Minutos após o envenenamento ocorrem alterações na epiderme (Rojas et al., 2017; Zanetti et al., 2002) e a ação do veneno no percurso em direção ao sistema vascular, com relação a comunicação celular que ocorre, é desconhecido. Por isso, seria interessante explorar um modelo experimental que permita analisar a resposta das células afetadas no contexto célula-célula e sinalização celular, a fim de obter melhor entendimento sobre a modulação disparada como consequência do envenenamento.

Sendo assim, com base nas alterações patofisiológicas que ocorrem após a picada de uma aranha-marrom e pelo aspecto da lesão é interessante analisar as respostas celulares das primeiras células expostas, queratinócitos e fibroblastos, no processo de envenenamento realizado pelas aranhas do gênero *Loxosceles*, espécie *intermedia* com foco nas PLD, já que por si só são capazes de desenvolver as lesões dermonecroticas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os aspectos moleculares e celulares da resposta inflamatória induzida pelo veneno total e da toxina Fosfolipase-D de aranha-marrom na modulação via membrana em queratinócitos e fibroblastos *in vitro*.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar toxinas recombinantes da família das fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia*.
- Analisar as alterações morfológicas, dinâmicas celulares e de matriz em queratinócitos e fibroblastos sobre o efeito do veneno total e da toxina fosfolipase-D em cultivo celular;
- Analisar as alterações bioquímicas dos componentes da membrana de queratinócitos e fibroblastos sob o efeito do veneno total e da toxina fosfolipase-D de aranha-marrom em cultivo celular;
- Analisar o conteúdo liberado pelas células expostas ao veneno total e fosfolipase-D de aranha-marrom, no contexto inflamatório, em ensaios de cultivo e co-cultivo *in vitro*.

- Analisar a interação entre queratinócitos e fibroblastos no contexto inflamatório induzido por veneno total e fosfolipase-D em ensaios de migração em cultivo celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARANHAS E LOXOSCELISMO

A toxilogia é uma área da ciência que estuda toxinas produzidas por microrganismos, plantas e animais. Venenos, de diferentes animais, são misturas complexas compostas por proteínas, peptídeos, enzimas e toxinas. No processo de envenenamento muitas moléculas, principalmente as toxinas, são identificadas por suas ações patológicas, entretanto muitos estudos já têm mostrado que essas moléculas podem ser usadas de forma benéfica ao ser humano, já que após identificado a função e ação molecular, estas podem ser utilizadas com potenciais biotecnológicos (Dutertre; Lewis, 2010; Lewis; Garcia, 2003). Um exemplo é o Captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina 1, também utilizado para o tratamento de câncer de fígado e foi isolado de serpentes brasileiras (Attoub et al., 2008).

Diversos estudos em toxilogia têm focado em veneno de aranhas a partir da gravidade e toxicidade do envenenamento, pois esses animais fazem parte do grupo de artrópodes que mais despertam o interesse médico. Os três gêneros mais pesquisados são: *Lactrodectus* (viúva-negra), *Phoneutriae* (aranha armadeira) e *Loxosceles* (aranha-marrom) (Isbister; Fan, 2011).

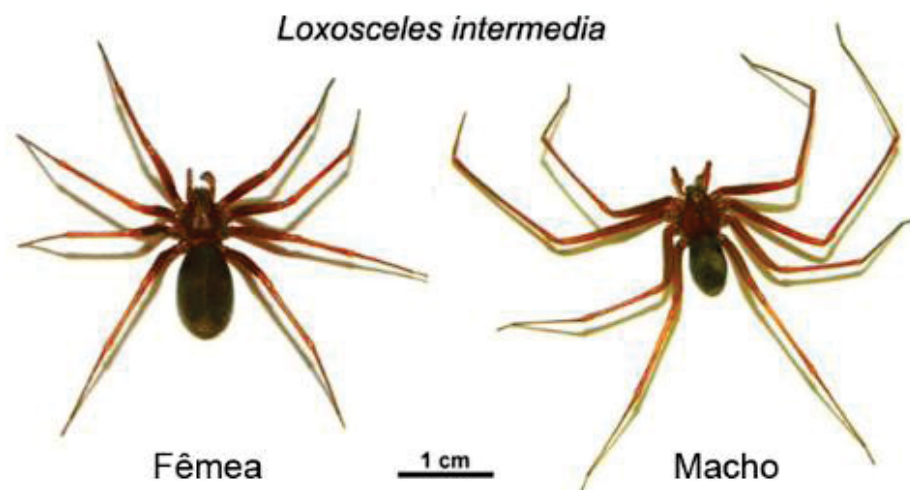
As aranhas são animais que fazem parte do filo Arthropoda, constituindo mais de 52.000 espécies agrupadas em mais de 4.300 gêneros. Possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen, variando de 5 mm a 15 cm de tamanho (Platnick; Raven, 2013; World Spider Catalog, 2024).

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Labidognatha, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda. Aproximadamente 170 espécies do gênero *Loxosceles* foram descritas e por serem cosmopolitas, estando distribuídas em regiões temperadas e em regiões tropicais, podem ser encontradas na África, Ásia, Américas, Europa e Oceania (World Spider Catalog, 2024). São popularmente conhecidas como aranha reclusa ou aranha-violino na América do Norte, e no Brasil conhecida como aranha-marrom (Chaim et al., 2011b;

Platnick; Raven, 2013), devido ao fato de sua coloração variar do marrom claro ao marrom escuro (Bertoni da Silveira et al., 2006; da Silva et al., 2004). Ainda no Brasil, 12 espécies deste gênero foram identificadas (World Spider Catalog, 2024).

Seu tamanho pode variar de 1 cm a 5 cm, sendo que o comprimento corporal varia de 8 mm a 15 mm e suas pernas de 8 mm a 30 mm, possuem seis olhos brilhantes organizados em pares e em semicírculo sobre o cefalotórax. Ainda com relação à morfologia, os machos possuem corpo pequeno e pernas longas, já as fêmeas possuem o corpo grande e pernas menores, conforme apresentado na FIGURA 1 (da Silva et al., 2004; Swanson; Vetter, 2006).

Figura 1. Características físicas de aranhas do gênero *Loxosceles*.



Legenda: Características físicas de aranhas *Loxosceles intermedia*.
Fonte: Chaim (2011b).

Esses animais têm um estilo de vida sedentário e hábitos noturnos, preferindo locais escuros. Em seu habitat natural, são encontrados em fendas, sob pedras, em cascas de árvores e restos de vegetais. No entanto, são bem adaptados a ambientes domiciliares, habitando locais como atrás de quadros, móveis, roupas, sofás, sapatos e cobertores, o que aumenta o risco de acidentes intradomiciliar de envenenamento para os humanos (Fischer; Vasconcellos-Neto, 2005; Vetter; Isbister, 2008). Embora as aranhas-marrons sejam conhecidas pelo potencial de causar lesões, elas não são agressivas por natureza. A picada é quase sempre imperceptível, ocorrendo geralmente quando as aranhas são comprimidas contra o corpo humano em ações cotidianas. As áreas do corpo mais frequentemente acometidas pelas picadas são a

coxa, o tronco e o braço (Fundação Nacional de Saúde (Brasil), 1998; Gremski et al., 2014; Isbister; Fan, 2011).

O gênero *Loxosceles* é considerado o que há de mais grave em termos de aracnismo no Brasil. A maior concentração de acidentes loxoscélicos acontecem na região Sul do país, particularmente no Paraná e Santa Catarina (Fundação Nacional de Saúde (Brasil), 1998). Em 2021, só no Paraná foram notificados 45.024 casos de acidentes loxoscélicos e 6 óbitos, sendo que Curitiba e as cidades próximas são as cidades que mais notificam acidentes por aranhas-marrom no Brasil (Sinan, 2024).

Os acidentes com aranhas-marrons, que resultam em envenenamento, desencadeiam um conjunto de sinais e sintomas denominado loxoscelismo. Este é conhecido principalmente pela sintomatologia cutânea que tem um desenvolvimento relativamente lento, porém que pode chegar a necrose, conforme FIGURA 2 (Malaque et al., 2015).

Figura 2. Lesões cutâneas no loxoscelismo.



Legenda: Evolução clínica do loxoscelismo cutâneo: (a) Lesão com equimoses e áreas de palidez 26 horas após a picada; o paciente recebeu antiveneno específico e corticosteroides; (b) Lesão com equimoses, palidez e bolhas 8 dias após a picada; (c) Escara necrótica 29 dias após a picada; (d) Lesão ulcerada 35 dias após a picada, que exigiu cirurgia plástica reconstrutiva.

Fonte: Malaque et al. (2015)

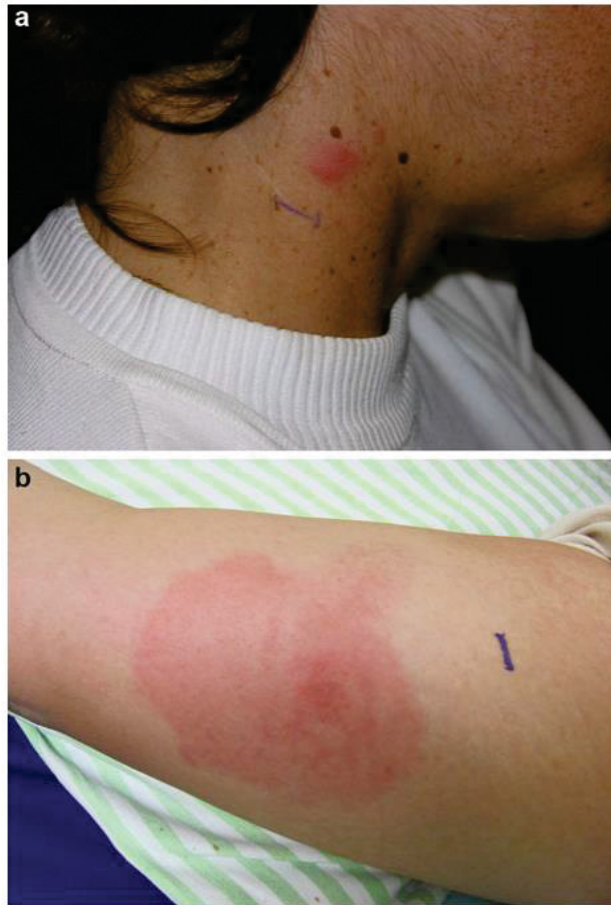
No período de 2 a 6 horas após a picada, é possível observar um eritema edematoso no local. Nas primeiras 24 horas, essa reação pode evoluir para uma mancha irregular e dolorosa, com áreas púrpuras intercaladas com áreas pálidas, frequentemente endurecidas e rodeadas por eritema. Posteriormente, podem surgir vesículas ou bolhas serosas, serossanguíneas e/ou hemorrágicas (Malaque et al., 2015).

Passados 7 a 10 dias após o envenenamento, a lesão desenvolve uma escara seca e necrótica (FIGURA 2B). Na segunda ou terceira semana, o tecido necrótico se separa, deixando uma úlcera de profundidade e extensão variáveis. Áreas com maior concentração de tecido adiposo, como coxas, nádegas e abdômen, geralmente evoluem para lesões mais graves. No entanto, nem todos os casos evoluem para necrose. Quando a necrose não se desenvolve, a lesão é chamada de forma edematosa, caracterizada por edema e eritema extensos (Malaque et al., 2015).

Os sintomas locais se acentuam nas primeiras 24 a 72 horas após o acidente (FIGURA 3), logo, a eficiência dos tratamentos depende principalmente do tempo que a pessoa leva para ir em busca de terapia (aproximadamente 24 horas), isso porque o veneno desenvolve rapidamente a lesão tecidual, podendo haver extensões irreversíveis (Barbaro et al., 2010). Entretanto, a gravidade do acidente pode estar relacionada com vários fatores, como: espécie da aranha, gênero do animal, condições imunológicas e a idade do indivíduo, entre outros (Nguyen; Pandey, 2019).

Além da forma cutânea, o envenenamento pode desencadear, simultaneamente ou não, sintomas sistêmicos, conhecidos como forma cutâneo-visceral. As alterações no estado geral dos indivíduos incluem fraqueza, febre alta nas primeiras 24 horas, dor de cabeça, erupção cutânea semelhante ao sarampo, coceira generalizada, pequenas manchas vermelhas, dor muscular, náusea, vômito, visão turva, diarreia, sonolência, confusão mental, irritabilidade e, em casos graves, coma (Fundação Nacional de Saúde (Brasil), 1998; Futrell, 2004). Embora os efeitos sistêmicos sejam menos frequentes, eles são mais graves e podem resultar em óbito. Distúrbios hematológicos, como hemólise intravascular (anemia), níveis elevados de bilirrubina (icterícia) e hemoglobinúria, geralmente se instalam nas primeiras 24 horas. Além disso, há a possibilidade de insuficiência renal aguda (Chaves-Moreira et al., 2009, 2011; Nguyen; Pandey, 2019; Swanson; Vetter, 2006).

Figura 3. Acentuação dos sintomas do loxoscelismo nas primeiras horas.



Legenda: Lesões cutâneas eritematosas resultantes de uma mordida de *Loxosceles*. Ambos os pacientes evoluíram sem necrose. (a) 10 horas após a mordida; (b) 24 horas após a mordida.
Fonte: Malaque, et al. (2015)

Quanto ao tratamento, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, o antiveneno é a única terapia eficaz para envenenamentos. No entanto, devido à falta de consenso sobre o tratamento e à necessidade de equilibrar a disponibilidade do antiveneno com a produção, especialmente nos países em desenvolvimento, que são os mais afetados, é necessário utilizar diferentes medicamentos para tratar os sintomas (World Health Organization, 2006). Exemplos de medicamentos utilizados incluem dapsona, anti-histamínicos, analgésicos e corticosteroides. Além disso, procedimentos como oxigenoterapia hiperbárica e terapia de pressão negativa sobre a ferida também são empregados.

No Brasil, o Ministério da Saúde limita o uso de antiveneno, direcionando esse tratamento apenas para pacientes com sintomas clínicos moderados a graves (Fundação Nacional de Saúde (Brasil), 1998). Sabendo que o veneno de *Loxosceles* foi amplamente estudado com descobertas sobre os diferentes componentes e suas ações bioquímicas e biológicas, a produção recombinante de proteínas e peptídeos

presente no veneno para utilização como antígenos, seguida de produção de antivenenos e vacinas seria uma ferramenta biológica eficaz para tratamento dos pacientes. Além da produção de medicamentos e agentes biológicos a partir de estruturas possíveis de serem utilizadas como inibidores específicos (Gremski et al., 2021).

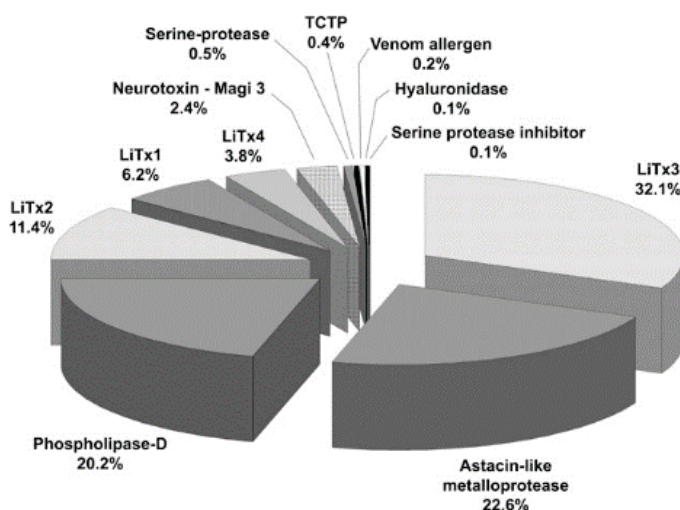
2.2 VENENO LOXOSCÉLICO

No processo de envenenamento, a aranha-marrom se defende inoculando em torno de 4 µl de veneno na pele do indivíduo, através do aparelho inoculador composto por um par de quelíceras. Trata-se de um líquido de aspecto cristalino e incolor produzido por um par de glândulas bulbosas localizadas no cefalotórax do animal. O volume de veneno produzido fica na ordem de microlitros, contendo 20-200 µg de proteína total. Esse volume pode variar de acordo com a espécie, tamanho, sexo, estado nutricional e idade da aranha (Gremski et al., 2014).

O veneno das espécies, *L. laeta*, *L. intermedia*, *L. adelaida* e *L. gaucho*, apresentam perfil proteico semelhantes, com massa molecular que variam de 1–135 kDa (Gremski et al., 2014), com maior concentração na faixa de 20-40 kDa (Chaim et al., 2011b). Entre os componentes identificados estão proteases, hialuronidases, fosfolipases, peptidases, collagenases, fosfatases alcalinas, 5'-ribonucleotidases, fosfohidrolases e toxinas inseticidas, todos avaliados bioquímica e biologicamente. Existem três classes principais de "moléculas altamente expressas" que constituem aproximadamente 95% dos transcritos codificadores de toxinas na glândula de veneno: fosfolipases-D, proteases do tipo astacina e peptídeos de baixa massa molecular bioquimicamente caracterizados como *Knottins* (peptídeos ICK) (Dantas et al., 2016; Gremski et al., 2010; Medina-Santos et al., 2022; Trevisan-Silva et al., 2017).

A FIGURA 4 apresenta resultados obtidos a partir do transcriptoma da glândula de *Loxosceles intermedia*, que confirma a presença das proteínas citadas anteriormente. Dados de uma análise proteômica em gel bidimensional, utilizando tecnologia de identificação de proteínas, revelaram a presença de 39 proteínas. Dentre essas, 14 foram identificadas como toxinas responsáveis pelos danos característicos do loxoscelismo, bem como encontradas no veneno de outros animais (dos Santos et al., 2009).

Figura 4. Proporções relativas de cada grupo de toxinas sobre o total transcritos codificadores de toxinas.



Fonte: Gremski [42].

Legenda: Transcritos codificadores de toxinas identificadas na glândula de veneno de *Loxosceles intermedia*, agrupadas de acordo com as características estruturais e funcionais das proteínas. LiTx- *Knottins/Similar to insecticidal toxins of L. intermedia*; TCTP – *Translationally controlled tumor protein*.

Fonte: Gremski et al. (2010)

Além de análises bioquímicas, com a progressão da lesão epitelial durante o processo de envenenamento, propriedades biológicas desses venenos loxoscélicos já foram experimentalmente simuladas *in vivo* e *in vitro*. Em 2010, Barbaro e seu grupo demonstraram que o veneno de *L. gaucho* provoca resposta inflamatória massiva devido ao aumento na síntese de citocinas inflamatórias em mediadores lipídicos, como prostaglandina E2 (PGE2) (Barbaro et al., 2010). Nowatzki et al. (2012) utilizou veneno de *L. intermedia* e mostrou que a interação do veneno pode ocorrer na membrana celular, além da internalização por células endoteliais.

Chatzaki et al (2012) utilizou *L. similis*, buscando diminuir os efeitos dermonecróticos partir de anticorpos α -*L.similis*, um antiveneno, que permitiu a visualização da diferença do potencial de lesão e a conclusão de que o veneno das fêmeas causa dermonecrose de maior área que a dos machos, além de maior imunização. Ou seja, a diferença dos venenos entre os sexos também influencia no potencial de resposta de defesa. Em 2014, Dantas et al (2014) estudaram a ação do veneno total de *L. similis* em cultivo primário de fibroblastos humano, percebendo a ativação de caspases após 48 horas de exposição celular, com consequente morte celular.

Analisando as respostas teciduais e celulares após a indução do envenenamento com veneno total, observou-se a ativação da sinalização inflamatória no local da picada, relacionada ao aumento da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias como PGE2 (Barbaro et al., 2010). Houve interação direta do veneno com superfícies celulares e estruturas teciduais, resultando na internalização do veneno, indução de toxicidade e ativação de caspases (Nowatzki et al., 2012). Além disso, o antiveneno demonstrou um potencial neutralizante e reatividade cruzada imunológica entre venenos de diferentes espécies de *Loxosceles*. Em todas essas respostas, a ação das PLD foi consideravelmente mantida e os epítomos mostraram-se altamente conservados nas análises imunológicas (Chatzaki et al., 2012).

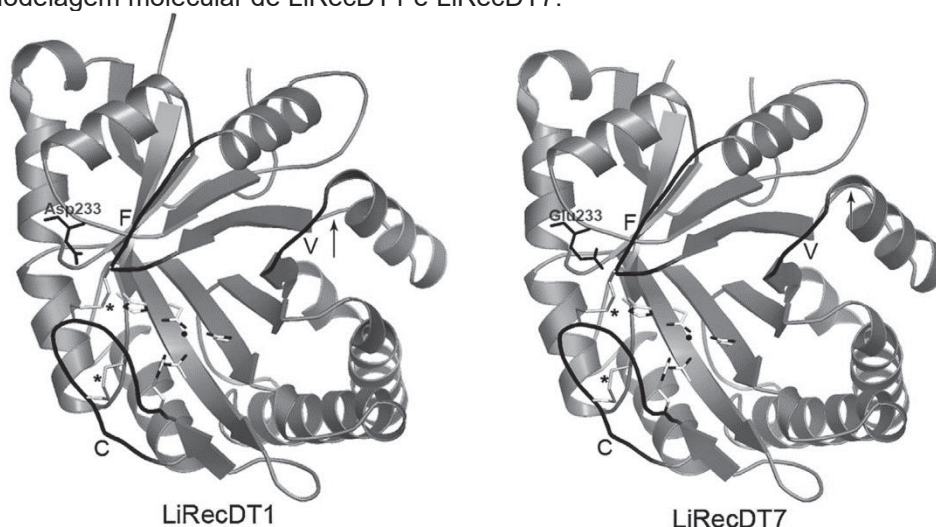
2.3 FOSFOLIPASES-D LOXOSCÉLICAS

Analisando o veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* foi possível caracterizar as PLD pela massa molecular (30–35 kDa) e identificar que todas são isoformas da mesma enzima, já que a identidade entre elas varia de 55% a 99% (Tavares et al., 2011). Essa variedade de isoformas está relacionada ao processo evolutivo do veneno contra uma diversidade de presas, demonstrando a conservação dos resíduos de aminoácidos 51-54 no *loop B* catalítico (domínio PCDC/S), 191-196 no *loop F* (domínio S/GDGITN) e 272-275 (domínio D/ENPW) presentes na região C-terminal, além da conservação do sítio catalítico, nos resíduos de aminoácidos H12, E32, D34, H48, D92 e K94 (Kalapothakis et al., 2007).

A PLD é uma classe de proteínas com um único domínio que se estrutura em um barril (b/a)8 ou barril TIM, o qual é o dobramento mais comum entre proteínas. Este dobramento inclui, internamente, um revestimento de oito folhas β ligadas por laços curtos e flexíveis a oito α -hélices da superfície externa do barril. Essas enzimas possuem um *loop* catalítico crucial contendo o aminoácido His 47, formando um gancho devido à presença de uma ponte dissulfeto (Cys51-Cys57). Além disso, apresentam um *loop* variável, um *loop* flexível e outros *loops* curtos que circundam o sítio ativo (de Giuseppe et al., 2011; Murakami et al., 2006).

Em estudos para identificação de PLD no veneno, nosso grupo obteve várias isoformas recombinantes de *Loxosceles intermedia*: LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5, LiRecDT6 e LiRecDT7. A FIGURA 5 apresenta a modelagem molecular das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT7, identificada pelo grupo (Vuitika et al., 2013).

Figura 5. Modelagem molecular de LiRecDT1 e LiRecDT7.



Legenda: Estrutura tridimensional de LiRecDT1 e LiRecDT7, na qual a seta indica a variação significativa dos *loops* em LiRecDT1 e LiRecDT7. As alças catalíticas (C), variável (V) e flexível (F) são indicadas. Os asteriscos indicam as pontes dissulfeto. Os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do Mg^{2+} no sítio catalítico são destacados (His12, Asp32, Glu34 e His47).

Fonte: Vuitika et al. (2013)

As PLDs são as toxinas mais estudadas, tanto biologicamente quanto bioquimicamente, do veneno loxoscélico, e também são encontradas em vírus, bactérias, leveduras, plantas e animais (Brandenburg; Pufe; Koch, 2014; Vuitika et al., 2016). Essas toxinas têm a capacidade de hidrolisar as ligações éster presentes nos fosfolípidios. Com o avanço no entendimento de sua ação enzimática, a nomenclatura dessas toxinas passou por mudanças. Inicialmente, eram chamadas de esfingomielinases-D (SMase-D), pois acreditava-se que hidrolisavam apenas esfingomielina. Posteriormente, foram redefinidas como fosfolipases-D, uma vez que demonstraram ser capazes de hidrolisar outros fosfolípidios (Lee; Lynch, 2005; Nguyen; Pandey, 2019; Swanson; Vetter, 2006; Vuitika et al., 2013).

São conhecidas como fator/proteína dermonecrótica, devido a sua principal atividade biológica ser induzir a dermonecrose, além de sozinha ser capaz de desenvolver a lesão. Por apresentarem um alto nível de identidade são chamadas de família LoxTox (*Loxosceles toxin*) (Kalapothakis et al., 2007). A partir das respostas sobre a similaridade entre as fosfolipases identificadas, a conservação entre as espécies, a atividade enzimática e importância dos aminoácidos que são conservados no sítio catalítico, foram promovidas mutações sítios dirigidas.

Na mutação identificada como LiRecDT1 H12A, o aminoácido histidina na posição 12 do sítio catalítico foi substituído por uma alanina, pois foi identificado como

um dos aminoácidos relevantes na ação enzimática. No entanto, essa mutação não foi suficiente para abolir toda a atividade enzimática. Na contínua identificação da importância de aminoácidos no sítio catalítico, foram realizados testes com toxinas recombinantes contendo diversas mutações, avaliando a ação dermonecrótica e citotóxica dessas toxinas por meio da quantificação da atividade enzimática (Chaim et al., 2011a). Com a confirmação da hipótese, esta e outras toxinas da família LoxTox foram utilizadas pelo nosso grupo como ferramentas para um melhor entendimento do mecanismo fisiopatológico do loxoscelism (Chaim et al., 2011a; Chaves-Moreira et al., 2011; Vuitika et al., 2013, 2016).

2.4 AÇÃO DAS FOSFOLIPASES-D E SEUS METABÓLITOS

Conforme dito anteriormente, as PLD têm atividade enzimática que catalisam uma reação de hidrólise, na qual o grupo amida é crucial para o reconhecimento e/ou catálise do substrato. Os substratos são os fosfolipídios de membrana, especialmente esfingomielina, lisofosfatidilcolina, além de lisofosfolipídios, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico (LPA - *Lysophosphatidic acid*) e ácidofosfatídico cíclico (Lee; Lynch, 2005). A hidrólise gera produtos como ceramida, ceramida 1-fosfato (C1P), esfingosina, esfingosina 1-fosfato e fosfatos de ceramida cíclicos, dependendo do local de clivagem da fosfolipase e a presença de outras enzimas, como ceramidase e esfingosina quinases (Chaim et al., 2011a; Horta et al., 2013; Rojas et al., 2017). Recentemente, Chaves-Moreira et al. (2023) identificaram que a LiRecDT1 não cliva a fosfatidilcolina, afirmando que o número de átomos de carbono no substrato determina a atividade ideal da PLD.

O LPA, um dos produtos secundários da atividade enzimática da PLD, é um lipídio bioativo proveniente da ação das fosfolipases sobre membranas celulares, que pode ainda ser formado através da ação de PLD sobre a lisofosfatidilcolina (Bumpus; Baskin, 2017; Murph et al., 2006; Nakamura et al., 2005). O LPA é conhecido por induzir respostas biológicas e patológicas como na interação célula-célula, rearranjo do citoesqueleto, proliferação e diferenciação celular (Bumpus; Baskin, 2017), agregação plaquetária, hiper permeabilidade endotelial e respostas inflamatórias. Isto porque este se liga a receptores acoplados à proteína G e ativa vias de sinalização associadas à MAPK ou ERK1/2, estimulando a expressão de mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas, mitógenos e fatores pró-angiogênicos (Stoddard; Chun, 2015; Yung; Stoddard; Chun, 2014; Zhao et al., 2014).

A C1P, outro produto secundário da atividade enzimática de PLD, é produzida diretamente pela hidrólise de esfingomielina ou pela fosforilação de ceramida pela ceramida quinase (CERK) (Gomez-Munoz et al., 2013; Maceyka; Spiegel, 2014). Ela é um componente da camada lipídica envolvida em diversos processos inflamatórios, pela capacidade que apresenta de estimular fosfolipases A2 citosólicas, que geram prostaglandinas; ou pelo estímulo de esfingomielinases ácidas (Gomez-Munoz et al., 2013). É capaz de estimular a proliferação celular pelo aumento da síntese de DNA, inibindo diretamente o LPA e bloqueando a síntese de ceramida e a apoptose (Lee; Lynch, 2005). Com diferentes níveis, a C1P pode ser associada a processos celulares como fagocitose, ativação de canais de íons, sobrevivência celular, tumorigênese e inflamação (Stock et al., 2012).

Em estudos para aprimorar os conhecimentos do mecanismo de ação das PLD, Dragulev et al. (2007) mostraram que a atividade de PLD sobre a membrana celular induz a expressão de moléculas inflamatórias (CXCL1, CXCL2, IL-6 e IL-8), com massivo infiltrado de neutrófilos, necrose, edema e proliferação de fibroblastos, observações corroboradas mais recentemente por Rojas (2017). Em 2008, Kusma mostrou que em células epiteliais de ratos tratados com a toxina recombinante LiRecDT1 houve um aumento de vacúolos citoplasmáticos e vesículas elétrons densas, o que pode indicar que a degradação de esfingolipídios ocorre em compartimentos lisossomais (Kusma et al., 2008). Horta et al. (2013) exploraram a ação de isoformas recombinantes de PLD do veneno de *L. similis* em fibroblastos, confirmando a liberação de citocinas e quimiocinas através do mecanismo mediado por receptores de LPA. O mesmo trabalho sugeriu, que o LPA, por ser tanto um fator de sobrevivência celular quanto um fator apoptótico, este não participe da apoptose induzida pelo veneno em fibroblastos ou em células endoteliais.

Diversos componentes do veneno das aranhas-marrons têm sido explorados quanto a sua atividade biológica, principalmente a fim de identificar quais são seus alvos e mecanismos moleculares e celulares no contexto do envenenamento. Para tanto, matriz extracelular com seus diferentes tipos de proteínas, como colágenos, laminina, entactina, entre outros proteoglicanos e glicosaminoglicanos, tem sido alvo de experimentação na busca de maior entendimento do processo de interação do veneno (Chatzaki et al., 2012). Isso porque já foi estudada a interação do veneno com a matriz extracelular e identificado que este degrada componentes da matriz que ativam o sistema complemento, recrutando leucócitos polimorfonucleares e plaquetas

promovendo a lesão local (Barbaro et al., 2010). Paludo et al. (2006) foram pesquisadores que demonstraram que o veneno total de *Loxosceles intermedia* afeta importantes componentes da matriz extracelular plasmática como a fibronectina e o fibrinogênio, e membrana basal como a entactina e o proteoglicano – heparan sulfato em células endoteliais.

Em 2011, Chaves et al. (2011) demonstraram que as PLDs estimulam o influxo de cálcio em eritrócitos por meio de canais do tipo "L". Estudos do grupo têm relacionado a atividade catalítica das PLDs com seu efeito tóxico em células endoteliais e epiteliais tubulares *in vitro*. Esses efeitos seriam provenientes da liberação de LPA e C1P no meio extracelular e da alteração na estrutura das membranas plasmáticas, resultando na perda do aspecto de monocamada, perda da adesão célula-célula, vacuolização e redução da viabilidade celular. Além disso, essas alterações promovem a liberação de moléculas pró-inflamatórias, que amplificam o efeito parácrino e mobilizam as células do microambiente, tipicamente observado em infiltrados inflamatórios e necroses coagulativas assépticas (Chaim et al., 2011a; Kusma et al., 2008; Ospedal et al., 2002).

2.5 QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS NO CONTEXTO DO ENVENENAMENTO

Os queratinócitos são células que estruturam o epitélio estratificado pavimentoso repondo novas células da epiderme. São células preenchidas por grânulos, componentes lipídicos, bem como enzimas hidrolíticas e outras proteínas. Certas quantidades de lipídios e enzimas são liberadas no espaço intercelular, passando a ficar preenchidos com ceramidas, colesterol e ácidos graxos. Como consequência, a mistura intercelular lipídica gera uma proteção cutânea (Ross; Pawlina, 2012).

Os fibroblastos são um tipo celular com alta capacidade de síntese de biomoléculas e baixa de reserva. Ao serem visualizadas em microscópio eletrônico é possível observar um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, ribossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias. Sintetizam colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos, componentes da matriz extracelular. Conforme vão sofrendo interferências que podem influenciar em sua atividade funcional modificam sua morfologia, diminuem compartimentos citoplasmáticos e reduzem a capacidade proliferativa. A diminuição da oferta de oxigênio, por exemplo, induz características de

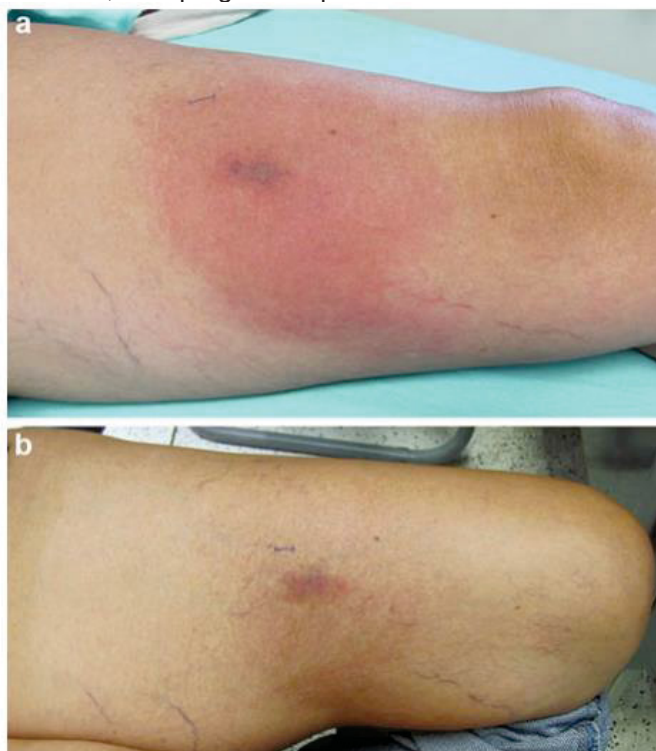
morte celular programada. A organização tecidual dos fibroblastos está relacionada ao processo de remodelação tecidual e composição da matriz extracelular. Na recuperação de lesões, migram para áreas afetadas produzindo matriz celular e cicatrização da lesão. Em algumas situações podem sofrer uma desregulação na atividade de síntese de matriz extracelular e aumentar a produção principalmente de colágeno (Ross; Pawlina, 2012).

Um estudo com queratinócitos epidérmicos de camundongos revelou que o TNF estimula o fluxo autofágico e a expressão de genes relacionados à autofagia através do NFkB. Esse processo de autofagia nos queratinócitos desempenha um papel crucial na regulação da cicatrização de feridas nos camundongos. Nos casos de inibição de autofagia, ficou evidenciado que há um prejuízo no reparo da pele, comprometendo a função dos queratinócitos, como proliferação e migração, além de suprimir a ativação de fibroblastos (Qiang et al., 2021).

Tanto queratinócitos, quanto fibroblastos foram igualmente pouco estudados na literatura no contexto do envenenamento por *Loxosceles intermedia* (Corrêa et al., 2016; Dantas et al., 2014; Desai; Lankford; Warren, 2000; Dragulev et al., 2007; Horta et al., 2013; Lopes et al., 2019; Lopes; Berg; Tambourgi, 2020; Paixão-Cavalcante et al., 2006; Rojas et al., 2017).

Após o envenenamento pela picada da aranha-marrom, o processo inflamatório gerado nas primeiras 24 horas deve-se a uma sinalização ainda não completamente esclarecida, que pode ou não evoluir para necrose, conforme mostrado na FIGURA 6 (Malaque et al., 2015). Sabe-se que a progressão dos eventos inflamatórios depende da comunicação entre células para sustentar o evento inflamatório, o que sugere a possibilidade de sinalização autócrina e parácrina simultânea por diferentes células (da Silva et al., 2004).

Figura 6. Lesão dermonecrótica, sem progressão para necrose.



Legenda: Evolução clínica do loxoscelismo cutâneo: lesão púrpura com halo eritematoso observada cerca de 24 horas após a picada. O paciente recebeu antiveneno específico e corticosteroides; evoluiu sem necrose. (a) Dia 1 após a picada; (b) dia 5 após a picada.

Fonte: Malaque, et al. (2015)

Estudos realizados pelo grupo buscaram respostas com relação à ação do veneno sobre as células endoteliais que são dependentes de ancoragem célula-célula e célula-matriz, para sua sobrevivência (Chaim et al., 2011a; Nowatzki et al., 2012). Em seu trabalho, Nowatzki et al. (2012) observaram que com poucas horas de exposição das células ao veneno de *L. intermedia* houve alteração no padrão de distribuição das integrinas $\alpha 5 \beta 1$, VE-caderinas e alteração morfológica com perda da adesão célula-célula. Sabe-se que células endoteliais sofreram alterações de fenótipos durante as etapas envolvidas na inflamação, isso porque a camada endotelial está em contato íntimo com o sistema circulatório, respondendo a estímulos de substâncias como citocinas IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral, proteína C reativa de fase aguda entre outros (Chaim et al., 2011a; Nowatzki et al., 2012).

Ainda no contexto do envenenamento diversos trabalhos têm focado na liberação de citocinas inflamatórias como CXCL1, CXCL2, IL-6 e IL-8, incubando células com isoformas recombinantes de PLD e venenos de diferentes espécies de *Loxosceles* (Dragulev et al., 2007; Horta et al., 2013; Rojas et al., 2017). Além da liberação de citocinas inflamatórias, têm sido estudada a ativação de caspase como

marcador de morte celular em células expostas por longos períodos com PLD de *Loxosceles* (Dantas et al., 2014).

Pesquisas utilizando queratinócitos humanos sugerem que a ação das PLD de *Loxosceles* induzem a apoptose, associada com um aumento na expressão de metaloprotease-2 e metaloprotease-9 celulares e que essa expressão poderia ser inibida com o uso de tetraciclina. A hipótese é a de que a própria célula esteja envolvida na expressão de MMP 2 e MMP 9, relacionando estas proteínas à patogênese do loxoscelismo cutâneo (Correa et al., 2016). Ainda pesquisando queratinócitos, outro grupo mostrou a indução de fator de TNF-alfa por *L. gaucho* e *L. deserta*, como proteína ativa no desenvolvimento da patologia *in vivo* (Paixão-Cavalcante et al., 2006).

Os efeitos cutâneos e sistêmicos que ocorrem após a picada da aranha-marrom diante do aspecto da lesão, fomentam a busca por uma resposta promovida pela comunicação celular. Um estudo imunopatológico e imunoquímico observou que a taxa de proliferação dos queratinócitos pode estar ligada à interação com os fibroblastos e que essa relação pode depender da sensibilidade da subpopulação de fibroblastos (Feitosa et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO DE VENENO TOTAL DE *LOXOSCELES INTERMEDIA*

Aranhas adultas de *Loxosceles intermedia* foram capturadas do ambiente na região metropolitana de Curitiba, Paraná, e mantidas em condições apropriadas (água *ad libitum* e temperatura ambiente) sob cuidados dos pesquisadores do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, do Departamento de Biologia Celular na Universidade Federal do Paraná, com aprovação pelo Sistema de Autorização em Informação da Biodiversidade (SISBIO- 29801-5).

Para extração do veneno as aranhas foram submetidas à eletrochoque de 15 volts no cefalotórax. Na sequência o veneno total foi obtido e coletado com o auxílio de uma micropipeta e armazenado em sistema refrigerado a -20 °C, conforme descrito por (Feitosa et al., 1998).

3.2 TRANSFORMAÇÕES DAS CONSTRUÇÕES EM CEPA BACTERIANA

As construções em vetor de expressão pET-14b das toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia* dermonecróticas (LiRecDT1) e com mutação sítio-dirigida no sítio catalítico (LiRecDT1 H12A) (Chaim et al., 2011a; Chaves-Moreira et al., 2009; Kusma et al., 2008) foram obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, do Departamento de Biologia Celular na Universidade Federal do Paraná.

Previamente à expressão das toxinas recombinantes, as construções foram transformadas por choque térmico em cepa bacteriana eletrocompetente BL21(DE3)pLysS. Após a transformação, as bactérias foram ressuspensas em meio SOC (triptona 20 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 0,5 g/l; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; glicose 0,2 M) e incubadas a 37 °C por 1 hora, constituindo a fase de recuperação. Em seguida, foi realizado o plaqueamento das bactérias em duas placas contendo meio LB ágar (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; ágar-ágar 15 g/l), ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml), sendo a primeira placa referente a uma fração de 100 µl da solução contendo as bactérias transformadas e a segunda placa referente a 900 µl. O plaqueamento foi realizado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas (protocolo adaptado de Chaves-Moreira et al. (2009) e Chaim et al. (2011a).

3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE *LOXOSCELES INTERMEDIA*

Após o crescimento das bactérias transformadas, uma colônia isolada foi escolhida para preparar um pré-inóculo contendo 15 ml de meio LB-líquido (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l), ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml) para a expressão de cada toxina recombinante. Os pré-inóculos foram incubados a 37 °C por 16 horas em agitação constante de 200 RPM em agitador orbital. Para a cultura de expressão das toxinas foi utilizada a razão 1:100 (pré-inóculo:meio LB-líquido); quando cada cultura atingiu uma D.O.₆₀₀~0,5 foi utilizado 0,05 mM de β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) a 30 °C por 3h30 para indução da expressão proteica. A amostra do tempo anterior à indução foi coletada (identificada como T0) e após 3h30 de expressão uma nova amostra foi coletada (identificada como T3,5). Estas alíquotas foram centrifugadas 4000 x g por 3 min, na sequência a fração solúvel de cada amostra foi descartada e o precipitado congelado a -20 °C. Finalizado o tempo de expressão, as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo, centrifugadas por 7 minutos a 7000 x g e os precipitados ressuspensos em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM) e lisozima 1 mg/ml por 30 minutos a 4 °C. Na sequência, as amostras foram submetidas à lise mecânica em prensa francesa- *French Press* (4 ciclos de 1000 psi cada) e centrifugadas a 14000 x g por 30 min. A fração solúvel foi separada do precipitado e ambos mantidos a 4 °C.

Após a lise, os produtos recombinantes solúveis referentes a cada expressão foram incubados por 1 hora a 4°C com resina de Ni-NTA Agarose previamente equilibrada com tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM), em agitação de 6 RPM. Na sequência foi utilizado o tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM) sucessivas vezes e então as proteínas recombinantes foram eluídas em tampão (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM). Protocolo adaptado (Chaim et al., 2011a; Chaves-Moreira et al., 2009).

3.4 EXPRESSÃO DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* POR SDS-PAGE

Para conferência da pureza e estabilidade das expressões da LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida 12,5%

contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes (contendo 5% de β -mercaptoetanol). Para isso foi utilizada uma solução de poliacrilamida com catalisadores APS e TEMED e sobre esta foi adicionada a solução de empacotamento, contendo 5% de poliacrilamida e catalisadores. Após a polimerização, as amostras foram alocadas nos poços submersos em tampão de corrida, com a separação das proteínas em corrente constante de 25 mA. Os géis foram corados com a solução de Azul de *Coomassie* Brilhante R-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, por 10 minutos à temperatura ambiente em agitação orbital constante. A descoloração foi realizada com metanol 30% em água deionizada, seguida de diversas trocas da solução de metanol. Em seguida, os géis foram fotografados pela multifuncional *Deskjet HP-2050/J510a*. Protocolo adaptado de (Chaim et al., 2011a; Chaves-Moreira et al., 2009).

3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Após a obtenção do veneno e das toxinas recombinantes, o conteúdo proteico foi quantificado pelo micro ensaio adaptado de Bradford (1976), utilizando o Azul de *Coomassie*, adaptado para leitura em placa de 96 poços. Trata-se de um método baseado na interação específica entre o corante *Brilliant Blue* G-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, predominantemente através de interações hidrofóbicas e ligações iônicas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, passando da coloração castanha para azul. A forma azul do corante tem um pico de absorbância de aproximadamente 595 nm. A intensidade da cor azul é proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

Para ser possível a análise quantitativa, uma curva padrão foi construída variando de 0,25 μ g – 2,00 μ g utilizando albumina do soro bovino. As amostras foram preparadas em duplicata, com diluição ou não, de acordo com a região de linearidade da curva, com volume final de 20 μ l e adicionado 200 μ l do reativo de Bradford (1:4) preparado em 4 partes de água. A determinação da absorbância é feita na faixa de 595 nm.

Todas as amostras de toxinas recombinantes foram mantidas a -20 °C, e previamente ao uso foram novamente dosadas por esta metodologia.

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE *LOXOSCELES INTERMEDIA*

Todo lote de toxina recombinante produzido pelo grupo é submetido ao ensaio de atividade enzimática como um controle da qualidade da amostra. Sendo assim as amostras de LiRecDT1, LiRecDT1-GFP e LiRecDT1 H12A foram avaliadas frente a atividade hidrolítica de lipídios utilizando um *kit* para detecção indireta da liberação de colina.

O ensaio preconiza a detecção da atividade fosfolipásica usando o reagente 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazine *Amplex Red*[®] (Molecular Probes, Eugene, EUA), um reagente fluorogênico sensível para H₂O₂. Cada toxina, bem como o veneno, foi incubada na concentração de 10 µg tendo a esfingomielina como substrato lipídico. Ao hidrolisar a esfingomielina em ceramida-1-fosfato e colina, esta é oxidada pela enzima colina oxidase à betaína e H₂O₂. Finalmente, a H₂O₂ na presença da peroxidase reage com o *Amplex Red*[®] estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o Resorufin. As reações foram realizadas em triplicatas, sendo as amostras incubadas a 37 °C por 30 minutos.

Para detecção da fluorescência emitida foi utilizado um espectrofluorímetro (M200 Infinite – TECAN, Männedorf, Switzerland) usando comprimento de onda de excitação em 560 nm e emissão em 590 nm. O protocolo foi adaptado de Chaim et al. (2011a).

3.7 CULTIVOS CELULARES

Como modelo biológico de estudo *in vitro* foram utilizadas duas linhagens celulares, uma de queratinócitos humanos HaCaT (do inglês: *Human adult skin keratinocytes propagated under low Ca⁺² conditions and elevated Temperature*) (Boukamp et al., 1988) gentilmente doada por pesquisadores do Departamento de Farmacologia, UFPR, e a outra de fibroblastos humanos HFF-1 (do inglês: *human foreskin fibroblasts* - ATCC[®] SCRC-1041[™]) gentilmente doadas pelo Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, via Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

Para realizar o cultivo da linhagem HaCaT estas foram mantidas em meio DMEM (do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Life Technologies Rockville, MD, EUA) com L-glutamina, com bicarbonato de sódio 1,5 g/l, suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Life Technologies

Rockville, MD, EUA), antimicrobiano (100 UI/ml de penicilina) (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA). Para realizar o subcultivo, as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS), em seguida foi adicionada ao cultivo a solução de PBS-EDTA (0,5 mM) por 10 minutos para iniciar o processo de desadesão celular, na sequência o PBS-EDTA foi retirado e então adicionado Tripsina-EDTA (0,25%-tripsina + 1 mM EDTA) por 10 minutos a 37 °C para ação enzimática. Após o total desprendimento célula-célula e célula-matriz a suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 1500 x g. O precipitado de células foi ressuspensionado em meio DMEM fresco contendo 10% de SFB. Na sequência as células foram cultivadas em garrafas ou placas (TPP- Techno Plastic Products Switzerland), de acordo com o ensaio a ser realizado.

Para realizar o cultivo da linhagem HFF-1 estas foram mantidas em meio DMEM (Gibco, Life Technologies Rockville, MD, EUA) com L-glutamina, com bicarbonato de sódio 1,5 g/l, suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Life Technologies Rockville, MD, EUA), antimicrobiano (100 UI/ml de penicilina) (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA). Para realizar o subcultivo, as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS), em seguida foi adicionada ao cultivo a solução de enzima digestiva Tripsina-EDTA (0,25%-tripsina + 1 mM EDTA) por 7 minutos a 37 °C para ação enzimática. Após o total desprendimento célula-célula e célula-matriz a suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 1500 x g. O precipitado de células foi ressuspensionado em meio DMEM fresco contendo 10% de SFB. Na sequência as células foram cultivadas em garrafas ou placas (TPP), de acordo com o ensaio a ser realizado.

Para definição da concentração a ser utilizada no trabalho, foi realizada uma triagem incubando diferentes concentrações de veneno total de *Loxosceles intermedia* - 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml - sobre HaCaT, com o intuito de identificar alterações passíveis de serem visualizadas em microscopia de contraste de fase. A concentração de 25 µg/ml foi determinada como a utilizada para ser aplicada nesse trabalho.

Além dos modelos celulares de queratinócitos humanos e fibroblastos humanos utilizados no trabalho, foi incluída a linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) (Buonassisi, 1973). Essa inclusão foi feita em colaboração com o trabalho de doutorado de Adriano Marcelo Morgon, também orientado pela professora Dra. Olga Meiri Chaim (Morgon; Chaim, 2017), e que gerou resultados com conteúdo

premiado com viagem para apresentação do trabalho na Argentina, anexo II e apresentado em congresso, anexo III.

A linhagem RAEC foi cultivada em meio F12 (mistura de nutrientes Ham's F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com L-glutamina, suplementado com bicarbonato de sódio (14 mM), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), antibiótico (100 IU/ml de penicilina) e antimicótico (100 µg/ml de estreptomicina) da Sigma (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Para o subcultivo, foram realizadas três lavagens com solução de EBSS (solução salina balanceada de Earl). Em seguida, foi adicionada ao cultivo uma solução de pancreatina diluída em EBSS (0,25% massa/volume). O complexo enzimático de pancreatina, também conhecido como viocase (Gibco, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), é composto por collagenases, elastases, esterases, nucleases e peptidases, extraído do pâncreas suíno. As células permaneceram sob ação enzimática por 30 minutos. Após esse período, 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 com 10% de SFB, e cultivadas em garrafas ou placas (TPP) de acordo com o ensaio a ser realizado.

Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida, sob tensão de 5% de CO₂, e estoques celulares foram mantidos em nitrogênio líquido, armazenados em tubos criogênicos, em solução de congelamento com 90% de soro fetal bovino e 10 % de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

3.8 EXCLUSÃO CELULAR COM CORANTE AZUL DE TRIPAN

Previamente a cada experimento, durante o processo de contagem celular para plaqueamento experimental foi realizado o teste de exclusão utilizando o corante vital azul de tripan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), permite uma quantificação do número de células viáveis, com o auxílio de uma câmara de contagem (Neubauer) celular e um microscópio. O ensaio baseia-se em células que apresentam suas membranas intactas e conseqüentemente excluem a entrada do corante no citosol, diferenciando-as de células que foram coradas em azul por apresentarem lesão na membrana plasmática que permite a entrada do corante.

Para o cálculo do número de células viáveis a serem utilizadas durante os ensaios experimentais foi utilizada a equação: Células viáveis (%) = (número de células viáveis por ml / número total de células) x 100 (Strober, 1997).

Depois do plaqueamento para cada experimento e de estar estabelecido o crescimento celular as linhagens foram lavadas duas vezes com PBS para retirar ao máximo o SFB presente no cultivo. Em seguida, as células foram submetidas ao processo de privação de nutrientes, no qual é utilizado o meio de cultivo DMEM, sem a suplementação com SFB, por duas horas. Ao final desse tempo, o meio de privação foi retirado, novamente lavado com PBS e então as condições de incubação no qual é utilizado o meio DMEM acrescido de veneno total de *Loxosceles intermedia* e as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A na concentração de 25 µg/ml foram realizadas.

3.9 EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR

Para a extração de membrana celular, foram utilizadas placas de 75 cm² da linhagem HaCaT e da linhagem RAEC, com 70% – 80% de confluência cada uma. Após o preparo celular, sob as condições especificadas, as linhagens foram submetidas a lavagem com PBS 1X, por duas vezes. Na sequência, as células foram mantidas em temperatura ambiente, por 10 minutos com 5 ml de tampão TNE adaptado (NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM pH 7.5, EDTA 5mM e Triton X-100 1% acrescido de iodoacetamida 10mM), contendo inibidores (benzamidina 10 mM e 1,10-fenantrolina 5 mM). Passados os 10 minutos, a cultura celular foi desprendida da placa de cultivo com auxílio de um raspador de células e esse conteúdo foi direcionado ao sonificador por 8 ciclos de 10 segundos cada um, a 50% de potência. Em seguida, o lisado foi incubado por 30 minutos a 4 °C e, então, centrifugado por 5 minutos a 500 x G a 4 °C. As amostras foram aliquotadas e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

3.10 PRECIPITAÇÃO PROTEICA EM AMOSTRAS CELULARES

A fim de tornar os extratos de membrana celular mais concentrados, as amostras obtidas e aliquotadas, com aproximadamente 700 µl cada uma, tiveram a adição de 175 µl de TCA 50% e deixadas em gelo por 25 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4 °C, a 20.000 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de água Mili-Q gelada pela parede do tubo. A amostra solubilizada com água, foi novamente centrifugada,

por 10 minutos a 4 °C, a 10.000 RPM. O sobrenadante foi removido e então os precipitados resultantes ressuspensos em 100 µl de tampão de amostra 1X, sem β-mercaptoetanol e sem azul de bromofenol. Essas amostras foram armazenadas a 4 °C, até o momento do uso. Protocolo adaptado de (Bae et al., 2007; Graziani et al., 2004).

3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ÁCIDO BICINCONÍNICO

O ensaio de dosagem de proteínas totais pelo *kit* de Micro BCA™ (Thermo Scientific™, Waltham, USA, #23235) é constituído por uma formulação com um reagente cromogênico compatível com detergente para detecção colorimétrica e consequente quantificação de proteína total utilizando amostras de proteína diluída (0,5-20 µg/ml). O ensaio Micro BCA começa com a reação de biureto, onde os íons cúpricos (Cu^{2+}) em meio alcalino reduzem-se a íons cúpricos (Cu^{1+}) na presença de proteínas. Os grupos peptídicos das proteínas catalisam essa reação. Os íons cúpricos (Cu^{1+}) formados na reação de biureto então reagem com o ácido bicinconínico (BCA) para formar um complexo púrpura. Trata-se de um ensaio sensível, com detecção abaixo de 0,5 µg/ml, que pode ser realizado em tubo de ensaio ou microplacas, sob exposição da reação à altas temperaturas (até 60 °C). A intensidade da cor púrpura é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. Essa intensidade é medida usando um espectrofotômetro a 562 nm, permitindo a quantificação da proteína.

Visto que esta é uma técnica utilizada para detecção de proteínas em extratos celulares, lisados teciduais, e frações subcelulares, previamente aos ensaios de imunodetecção utilizando amostras provenientes do cultivo celular, as amostras foram submetidas à dosagem de proteínas totais utilizando o *kit* de Micro BCA. Esta foi a técnica escolhida por ser um ensaio compatível com muitos detergentes e outros componentes comuns em amostras biológicas, que poderiam interferir em outros métodos de quantificação de proteínas.

3.12 VIABILIDADE CELULAR POR QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP

Para a avaliação dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), foram plaqueadas 6×10^3 células da linhagem HaCaT por poço em placas brancas de 96 poços. Após 24 horas de plaqueamento as células foram submetidas a um processo de privação de nutrientes (SFB) por 16 horas e então incubadas com 5 µg/ml e 10 µg/ml de cada

toxina recombinante e do veneno total de *Loxosceles intermedia*, em um total de 100 µl de meio DMEM por poço, com análises em 0 hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas e 24 horas.

Para realização desta metodologia foi utilizado o *kit CellTiter-Glo*® (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), que através de um ensaio homogêneo permite que células metabolicamente ativas, após serem lisadas, participem da reação na qual a mono-oxigenação da luciferina é catalisada pela luciferase na presença de Mg^{2+} , ATP e oxigênio molecular. Durante a lise celular enzimas endógenas como ATPases são liberadas e estas são necessárias para a reação química do kit gerar um sinal de luminescência que são mensuradas em quantidades proporcionais aos níveis de ATP produzidos e são estáveis por aproximadamente cinco horas.

A leitura do *kit CellTiter-Glo* foi feita em unidades relativas de luminescência, e essa luz foi medida por um luminômetro.

3.13 MORFOLOGIA CELULAR AVALIADA POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

Células vivas, geralmente não possuem contraste suficiente para serem observadas utilizando microscópios de luz comuns (Yin et al., 2015). A microscopia de contraste de fase é uma técnica não invasiva que utiliza como princípio a difração da luz, útil para a observação das estruturas de células vivas sem coloração (Zernike, 1955).

Com o objetivo de analisar a morfologia celular, as linhagens HaCaT e HFF-1 foram expostas à ação do veneno total de *Loxosceles intermedia* e às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, todos na concentração de 25 µg/ml. Para isso, foram plaqueadas $2,2 \times 10^5$ células por poço utilizando placas de seis poços. Após 48 horas as células foram submetidas à privação de nutrientes e então às incubações nos tempos de 0 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas e 24 horas, com volume final de 2 ml.

Para visualização da morfologia e captura das imagens por microscopia de contraste de fase foram utilizados os microscópios invertidos Leica DM IL, com uma câmera digital *Sony CyberShot 7.2 Mega Pixels* acoplada, com zoom frontal 2.0, e o microscópio de fluorescência Zeiss, Oberkochen, Alemanha. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o *software Photoshop CS5 extended* versão 12.0 x 64,

ImageJ 1.53 e *ImageJ* 1.54f (NIH) (Schneider; Rasband; Eliceri, 2012). A relação brilho e contraste foram padronizados na edição de imagens.

3.14 VIABILIDADE CELULAR POR CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

O corante vital Vermelho Neutro (VN – Merck, Darmstadt, Alemanha) é um corante catiônico, vital que adentra as células por difusão passiva. Dentro das células viáveis esse reagente é direcionado para o sistema endossomo-lisossomo, onde se fixa a grupos aniônicos através de ligações hidrofóbicas eletrostáticas. A absorção de vermelho neutro depende de a capacidade da célula manter os gradientes de pH através da produção de ATP. Após a adição de uma solução de etanol acidificada, que seja quantificada espectrofotometricamente a absorbância indicando os níveis de corante captados na cultura de células plaqueadas. Protocolo adaptado (Repetto; del Peso; Zurita, 2008).

As alterações de viabilidade decorrentes do comprometimento do sistema endossomo-lisossomo e da fluidez da membrana resultam numa redução da incorporação do VN, podendo-se assim mensurar espectrofotometricamente a citotoxicidade induzida em cultura de células plaqueadas (Kusma et al., 2008).

Para realizar este ensaio, a linhagem HaCaT foi exposta à ação do veneno total de *Loxosceles intermedia* e às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, todos na concentração de 25 µg/ml. Para isso, foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células por poço, em placas de 96 poços. Após 48 horas as células foram submetidas à privação de nutrientes e então às incubações nos tempos de 0 hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas e 24 horas, com volume final de 100 µl de cada condição de incubação, com veneno total ou toxina recombinante.

Ao término de cada exposição as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e incubadas com 200 µl de Vermelho Neutro (1:100) por 2 horas, em seguida foi utilizada uma solução contendo 50% etanol 96%, 49% água deionizada e 1% ácido acético e após 10 minutos foi realizada a quantificação da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS com faixa de absorbância de 200 nm a 700 nm, para microplacas (BioTek Epoch, Winooski, Vermont, EUA). Foram utilizadas microplacas de 96 poços, transparentes e de fundo chato (TPP), mensuradas em comprimento de onda de 540 nm.

3.15 CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT

Trata-se de um ensaio sensível e quantitativo, amplamente utilizado para medir a atividade metabólica celular, sendo também aplicado para inferir a viabilidade celular e a citotoxicidade de drogas, desenvolvido por Mosmann et al. (1983).

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, conhecido como brometo de MTT, pode atravessar as membranas celular e mitocondrial, sendo reduzido a cristais de formazan por células metabolicamente ativas devido à sua carga positiva e estrutura lipofílica. Esses cristais apresentam cor púrpura ou violeta-azulada, bem como baixa solubilidade aquosa. O formazan produzido pode ser solubilizado por um solvente como dimetilsulfóxido (DMSO) sobre a cultura, e a natureza cromogênica desta reação redox permite uma medição colorimétrica permitindo mensurar a diferença da redução dos cristais sob as diferentes condições. A densidade óptica (DO) da solução desta solução foi quantificada em comprimento de onda de aproximadamente 570 nm (Berridge; Herst; Tan, 2005; Ghasemi et al., 2021).

Para mensurar possíveis alterações citotóxicas causadas às células, as linhagens HaCaT e HFF-1 foram expostas à ação do veneno total de *Loxosceles intermedia* e às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, todos na concentração de 25 µg/ml. Para isso, foram plaqueadas 2×10^4 células por poço em placa de 96 poços. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram submetidas à privação de nutrientes e então HaCaT foram submetidas a incubação por 1 hora, 6 horas e 8 horas, e HFF-1 por 1 hora, 6 horas e 16 horas, com volume final de 100 µl de cada condição de incubação, com veneno total ou toxina recombinante. Na sequência aos períodos de tratamento especificados anteriormente foi adicionado 20 µl de uma solução estéril de MTT (5 mg/ml em PBS) por poço. Em paralelo, foi adicionado 20 µl da mesma solução em poços sem células, como controle. Após 3h30 de incubação a 37 °C os meios foram delicadamente retirados e logo em seguida, adicionado 150 µl da solução solvente (4 mM HCl, 0.1% Nonidet P-40 (NP40) em isopropanol para eluição dos cristais. As placas foram mantidas em agitação orbital por 15 minutos, com uma frequência de 20 oscilações por minuto, e dentro de 1 hora foi realizada a quantificação da absorbância, em leitor de ELISA Meridian Diagnostic ELx800 Universal Microplate Reader (Indianapolis, Indiana, EUA).

3.16 CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA

O ensaio de coloração com o corante Cristal Violeta (Feoktistova; Geserick; Leverkus, 2016) é um método para detectar a manutenção da aderência das células já que o reativo é um corante catiônico que se liga ao DNA e proteínas das células. Quando as células são fixadas (geralmente com metanol ou formaldeído), o corante se liga de maneira estável ao conteúdo celular. Após a fixação das células, o cristal violeta é adicionado e permite que as células viáveis fiquem coradas. Células mortas, que já perderam integridade, podem reter o corante, em função do material nuclear, ainda que de forma pouco eficiente.

A linhagem HaCaT foi semeada em uma placa de 96 poços, com 2×10^4 células por poço, sempre em quintuplicata. Para normalização, foram utilizados poços contendo apenas o corante, sem células. Após 24 horas de plaqueamento, estas foram submetidas a um processo de privação de nutrientes por 2 horas e expostas à ação do veneno total de *Loxosceles intermedia* e às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, todos na concentração de 25 µg/ml, com volume final de ≥ 100 µL/poço, incubadas por 1 hora, 4 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas. sobre HaCaT. Em seguida o meio foi retirado das células, essas foram submetidas a uma lavagem vagarosa de PBS, adicionado 100 µL de paraformaldeído 4% e incubado por 10 minutos. O paraformaldeído foi retirado, em seguida adicionado 100 µL de metanol 2% por 10 minutos e então retirado o metanol.

Foi adicionado 50 µL de solução de Cristal Violeta (0,5%) a cada poço, incubado por 20 minutos à temperatura ambiente, em agitação orbital com uma frequência de 20 oscilações por minuto. A seguir, a placa foi mergulhada quatro vezes em recipiente com água e na sequência a placa foi invertida sobre um papel filtro, para remover qualquer líquido restante. Durante o processo de secagem, a placa foi protegida da luz e permaneceu sem tampa entre 16 horas e 24 horas.

Para leitura em absorbância de 570 nm (OD 570), foram adicionados 200 µL de metanol a cada poço e a placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, em agitação orbital de bancada com uma frequência de 20 oscilações por minuto. Absorbância em leitor de ELISA Meridian Diagnostic ELx800 Universal Microplate Reader (Indianapolis, Indiana, EUA).

3.17 FRACIONAMENTO DE MEMBRANA CELULAR RESISTENTE À DETERGENTE (BALSAS LIPÍDICAS)

A técnica de separação de membrana resistente a detergente (*detergent-resistant membrane*, DRM) é um método utilizado para isolar e estudar as microdomínios de membrana plasmática conhecidos como "*raft domains*" ou "*lipid rafts*". Estes microdomínios são ricos em colesterol, esfingolipídeos e proteínas específicas, e desempenham papéis cruciais em diversos processos celulares. A principal característica das balsas lipídicas é sua resistência à solubilização por detergentes não iônicos a baixas temperaturas (como Triton X-100). Enquanto a maioria da membrana plasmática é solubilizada por esses detergentes, as balsas lipídicas permanecem intactas.

Para este ensaio, foram utilizadas células da linhagem HaCaT com 70% - 80% de densidade celular, cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75 cm² em condições normais de cultivo, ou seja, meio DMEM acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino. Para isso, as células foram cultivadas até densidade celular necessária e dissociadas com o auxílio da enzima tripsina. Em gelo, o *pellet* obtido foi ressuspensionado em 750 µl de Tampão TNE adaptado (NaCl 150 mM, Tris-HCl 25mM pH 7,5, EDTA 5 mM, MgCl₂ 10 mM, acrescido de inibidores de proteases) e alocados em um tubo de ultracentrifugação gelado. Sobre a amostra celular ressuspensionada em TNE foi colocado, vagarosamente, 4 ml da solução de sacarose a 35% e em seguida 4 ml da solução de sacarose a 5%, o que permitiu a formação do gradiente. As amostras foram submetidas a 16 horas de ultracentrifugação a 39.000 RPM a 4 °C e então foram retiradas 12 amostras contendo 800 µl das frações. A cada fração foi adicionado ácido tricloroacético 10% (TCA) com objetivo de concentração das amostras, protocolo adaptado (Bae; Yang; Rezaie, 2007; Graziani et al., 2004; Norambuena; Schwartz, 2011).

3.18 IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOTTING

Para os ensaios utilizando *Western blotting*, as amostras oriundas do cultivo celular, sejam elas extrato total de célula, extrato de membrana, conteúdo citoplasmático ou sobrenadante celular foram submetidas a dosagem de proteínas, conforme item 3.11 da seção de materiais e métodos e em seguida submetidas a uma corrida eletroforética por SDS-PAGE com malha entre 12,5% e 15%. Na sequência as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose através do sistema

Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad), previamente ambientadas em tampão de transferência (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20%, pH 9,2), através de uma corrente elétrica com tensão de 15 V por 15 minutos e então corada com Ponceau-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

Confirmada a qualidade da transferência das proteínas, em função do corante utilizado anteriormente, a membrana foi incubada por duas horas com uma solução de bloqueio contendo 3% de BSA em Tampão TBST (NaCl 120 mM, Tris-Base 20 mM, Tween-20 0,05%), cuja função é impedir que os anticorpos se liguem à membrana de forma inespecífica. Na sequência a membrana foi submetida a três lavagens com TBST, de 5 minutos cada uma. Em seguida, a membrana foi incubada com os respectivos anticorpos primários, sob diferentes concentrações, por um período de 16 horas.

Para que as proteínas fossem identificadas, foram utilizados anticorpos ligados covalentemente à fosfatase alcalina ou peroxidase, as quais foram reveladas a partir do uso de um substrato. Nos locais onde os anticorpos secundários se ligaram aos primários, a enzima presente promoveu uma reação que permitiu localizar a proteína de interesse (Towbin; Staehelin; Gordon, 1979).

Para detecção da peroxidase, foi utilizado o quimioluminescente *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, EUA), um substrato para detecção da peroxidase baseado em luminol as imagens das membranas foram obtidas através do fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE). Para a detecção da fosfatase alcalina, foi utilizado o sistema de revelação *1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution* (ThermoFisher Scientific, #34042) no qual a combinação de BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate *p-toluidine salt*) e NBT (*nitro-blue tetrazolium chloride*) geram precipitados preto-púrpura insolúveis a partir do conjugado enzimático, na sequência as membranas foram registradas utilizando uma impressora multifuncional *HP deskjet F4180*.

Para identificação de fosfolipase-D em amostras de extrato de membrana, foi utilizado o anticorpo primário anti-PLD (1:3000), gerado pelo grupo pesquisa trabalhado.

Para identificação de proteínas relacionadas ao processo de fracionamento de membranas, foram utilizados os anticorpos primários anti-flotilina-1 (1:1000) (Cusabio, Hubei, China), anti-caveolina-1 (1:1000) (Cusabio, Hubei, China) e anti-GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (1:7000) (Cusabio, Hubei, China).

Para identificação de proteínas relacionadas ao processo de isolamento de lisossomos, foram utilizados os anticorpos primários anti-F-actina (1:500) (Invitrogen), anti-LAMP-1 (1:10.000) (Invitrogen), anti-LAMP-2 (1:1000) (Invitrogen) e anti-catepsina D (1:5000) (Invitrogen).

3.19 IMUNODETECÇÃO DE FOSFOLIPASE-D POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Para realização deste ensaio foram plaqueadas 3×10^4 células da linhagem de fibroblastos humanos por lamínula de vidro e após o restabelecimento da membrana celular e morfologia das células estas foram submetidas à privação de nutrientes por 2 horas e na sequência expostas à toxina LiRecDT1-GFP por períodos de 1 hora, 6 horas, 16 horas e 24 horas. A escolha pela utilização da proteína expressa de forma conjugada com a GFP deve-se à facilidade de rastreamento e localização da GFP dentro das células. A inserção do gene GFP em plasmídeos e a transfecção em células são técnicas bem estabelecidas, tornando o uso da GFP relativamente simples e acessível.

Após a exposição à toxina, as células foram lavadas com tampão PBS, fixadas com paraformaldeído 2% por 30 minutos, novamente lavadas com PBS e a seguir foram incubadas com glicina 0,1 M por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram novamente lavadas com PBS e incubadas com PBS/BSA 1% + Saponina 0,02%, por 15 minutos para a permeabilização da membrana plasmática. Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários na presença de BSA 1% + Saponina 0,02%, por 1 hora a 4 °C. Nos ensaios em que não havia necessidade de avaliação da internalização da proteína foi utilizado PBS/BSA 1%.

Para a detecção da proteína LiRecDT1-GFP, foi utilizado anticorpos policlonais anti-GFP produzidos em cabras (1:200) (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, EUA). Para a identificação do citoesqueleto, os filamentos de actina foram marcados utilizando Faloidina (1:200, Santa Cruz Biotechnology), por 1 hora a 4 °C. Em seguida as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários na presença de BSA 1% + Saponina 0,02%, por 40 minutos a 4 °C, sendo que os anticorpos policlonais anti-cabra estavam conjugados com Alexa Fluor® 488 (1:250) (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA) para a detecção da LiRecDT1-GFP e conjugados com Alexa Fluor® 647 (1:250) (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, EUA). A seguir as amostras foram lavadas novamente com PBS e então todas foram incubadas com o reagente DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole

dihydrochloride), por 10 minutos a 4 °C, que emite fluorescência azul ao se ligar às regiões “AT” do DNA. (1:10.000, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA).

Ao final as lamínulas foram aderidas e fixadas às lâminas de vidro com o meio de montagem Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, EUA) para análise através do microscópio confocal LEICA SR GSD 3D, Wetzlar, Alemanha.

3.20 MORTE CELULAR ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Em um processo de morte celular caracterizado por apoptose, uma característica marcante é a translocação da fosfatidilserina (fosfolípido de membrana) da face interna da membrana para a face externa. Nesse processo de sinalização às células fagocitárias, é possível utilizar uma proteína que possui alta afinidade por membranas contendo fosfatidilserina, a Anexina-V, como ferramenta para avaliação quantitativa de células em estágios precoces e intermediários de apoptose (Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995).

Outro processo de morte celular, conhecido por necrose, é caracterizado por supressão metabólica e lise, aumento de volume celular e das respectivas organelas. O processo desencadeia a permeabilização precoce da membrana celular, por isso, a utilização do 7-amino actinomicina D (7-AAD) para marcar DNA pode ser realizado para identificar células em estágios tardios de apoptose, ou mesmo considerado necrose. Afinal, células metabolicamente ativas não permitem a entrada do 7-AAD (Galluzzi et al., 2012).

Para este ensaio foram plaqueadas 2×10^5 células em placa de 35 mm das linhagens HaCaT e HFF-1, independentemente. Após 24 horas de plaqueamento foram submetidas ao processo de privação de nutrientes por 2 horas e incubadas com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes 25 µg/ml, nos tempos de 1 hora e 4 horas para queratinócitos e 1 hora, 6 horas e 24 horas para fibroblastos.

Por se tratar de uma avaliação de apoptose, o sobrenadante celular que continha células não aderidas foi colocado em tubo cônico e centrifugado a 800 x g por 5 minutos, enquanto o restante das células foi lavado duas vezes com PBS. As células foram desaderidas das placas com o uso de enzima Tripsina-EDTA (0,25%) e então transferidas ao mesmo tubo cônico para centrifugação (1500 RPM por 5 minutos). Os sobrenadantes foram descartados, as células foram homogeneizadas com PBS a 4°C e centrifugadas novamente, realizando esse processo duas vezes. Na sequência as células foram ambientadas com *Binding Buffer* (HEPES 0,1 M pH 7,4,

NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM), 100 µl para cada 1 x 10⁶ células e transferidas para um micro tubo.

Para marcação de apoptose inicial foi utilizada a proteína Anexina-V conjugada com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), homogeneizado e incubado às células por 20 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. E para identificação de apoptose tardia foi utilizado o 7-AAD (1:100), homogeneizado e direcionado para análise por citometria de fluxo, que no momento da quantificação foi adicionado a cada micro tubo 300 µl de *Binding Buffer*. Células duplamente marcadas, ou seja, com Anexina-V e 7-AAD, são consideradas em estágio de necrose ou final de apoptose.

As amostras foram processadas utilizando BD Acuri™ C6 *Flow Cytometer Instrument Manual*, examinando 100.000 eventos por agrupamento de células. Em cada contagem foram analisados parâmetros como FSC (do inglês: *Forward Scatter*), que mede o tamanho relativo das células e SSC (do inglês: *Side Scatter*), que mede granulosidade ou complexidade da célula; de acordo com a intensidade de fluorescência (do inglês: *fluorescence levels*, FL), pelos canais FL1 e FL3. O canal FL1, filtro verde, foi usado para detectar a fluorescência emitida por Anexina-V FITC (530/30 nm). O canal FL3, filtro vermelho, foi usado para detectar a fluorescência emitida por 7-AAD (670 LP).

3.21 MEMBRANA CELULAR AVALIADA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTO DESEMPENHO

Com o objetivo de promover a separação e consequentemente identificação lipídica das membranas celulares das linhagens de HaCaT e HFF-1, foi realizado o ensaio de HPTLC (do inglês: *High-Performance Thin-Layer Chromatography*). Para isto as células foram cultivadas em placas de cultivo celular p100 (60,8 cm²) com aproximadamente 80% de densidade celular, lavadas com PBS várias vezes para retirar o excesso de SFB. Durante 2 horas foram mantidas em meio DMEM com supressão de SFB e na sequência incubadas com DMEM + LiRecDT1 25 µg/ml por 1 hora e 2 horas de incubação. A seguir foram novamente lavadas com PBS e com o auxílio de um raspador foram retiradas e lisadas das placas de cultivo celular.

Foram ressuspensas com 100 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e analisadas por cromatografia de alto desempenho em camada delgada. O ensaio foi realizado em placas de sílica 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 classe lipídica avaliada. Para visualização dos fosfolipídios as placas foram borrifadas com primulina 0,01% e os lipídeos visualizados através do uso de luz UV. Protocolo adaptado (Straus et al., 1993). As análises por HPTLC foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Sérgio de Toledo, na Universidade Paulista de Medicina - São Paulo.

3.22 PROCESSO AUTOFAGICO AVALIADO POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Para a realização deste ensaio, 7×10^4 células da linhagem RAEC foram plaqueadas em placas de vidro de 35 mm de diâmetro (*In Vitro Scientific*). Após 24 horas, essas células foram transfectadas com o plasmídeo mRFP-GFP-LC3 (Lau et al., 2013), gentilmente cedidos pela professora Dra. Lia Nakao. O plasmídeo utilizado, possui marcação fluorescente em tandem, e para transfecção foi utilizando Lipofectamine Plus (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Dezesesseis horas após a transfecção, as células foram submetidas a duas horas de supressão de SFB e, em seguida, expostas por 4 horas e a diferentes condições: hidroxicloroquina (HCQ) (100 µM) como droga inibitória de autofagia, solução salina HANK (HBSS) como indutor de autofagia (500 µl), controle (10% SFB em 500 µl de meio fresco), veneno total 10 µg/ml, LiRecDT1 50 µg/ml, LiRecDT1 H12A 50 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. Por saber que a privação de nutrientes aumenta o fluxo autofágico, neste ensaio as células utilizadas como controle tiveram o SFB mantido.

Foi utilizado o construto mRFP-GFP-LC3 como ferramenta para analisar o fluxo autofágico celular. Essa análise é viabilizada pela co localização das fluorescências verde e vermelha produzidas pelo tandem fluorescente conjugado com LC3. Essa abordagem fornece informações sobre a formação e a depuração de autofagossomos de acordo com a literatura (Kimura; Noda; Yoshimori, 2007; Zhou et al., 2012), em condições de aumento do fluxo autofágico, o LC3 é recrutado para a membrana do autofagossomo. Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, a fluorescência do GFP é diminuída pelo pH ácido do lisossomo, permitindo a visualização predominante de pontos vermelhos.

As imagens foram obtidas usando o microscópio Zeiss Observer.Z1 com o *software* Slidebook 4.2.0.11 (Intelligent Imaging Innovations, Inc).

3.23 ISOLAMENTO DE LISOSSOMOS POR CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL E GRADIENTE DE DENSIDADE

A técnica de isolamento de lisossomos tem como um dos objetivos fazer uma análise complementar de processos autofágicos, visto que ao isolar lisossomos e medir a atividade enzimática ou a presença de marcadores específicos, é possível avaliar a progressão do processo autofágico desde a formação do autofagossomo até a degradação no lisossomo. Além disso, é possível avaliar proteínas envolvidas na formação de autofagossomo.

Para este ensaio, foram utilizadas 3 placas de 75 cm² com 70% – 80% de confluência de RAEC, cada uma. Após 24 horas de plaqueamento as células foram submetidas a um processo de privação de nutrientes (SFB) por 16 horas e então as células foram descoladas da placa conforme protocolo evidenciado no item 3.7 da seção de materiais e métodos deste trabalho.

Após o processo de desadesão da placa, as células foram ressuspensas em 5 ml de PBS 1X, centrifugadas por 10 minutos a 500 x g e o sobrenadante foi descartado. Na sequência, as células foram ressuspensas em 5 ml do meio de homogeneização (HM) [sacarose 0,25 M, Na₂EDTA-100 mM 1mM, HEPES-100mM 10mM, contendo coquetel de inibidores (Sigma–Aldrich, USA); pH 7], centrifugadas por 10 minutos a 500 x g. Por fim, sobrenadante novamente descartado e então foram ressuspensas em 3 ml de HM.

A seguir as células foram homogeneizadas com uso do homogeneizador mecânico Potter-Elvehjem em 5 passos, e ao retirar o homogeneizado celular, o homogeneizador foi lavado com mais 0,5 ml de HM, que foi adicionado ao homogenato. Esse homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 800 x g, o sobrenadante foi direcionado para um tubo novo e mantido em gelo. O pellet foi ressuspendido em 1 ml de HM usando o vórtex, enquanto mantido em gelo. Esse processo, desde a homogeneização, reserva do sobrenadante até a ressuspensão, foi repetido. A suspensão final de sobrenadantes teve HM adicionado para chegar a um volume final de 3,5 ml como amostra.

Em tubo de ultracentrífuga, para cada 3mL de amostra, era adicionado 180 µl de BSA 10%, 1 ml de solução estoque de Percoll, 90% v/v (9 volumes de Percoll, 1 volume de diluente Percoll – sacarose 2,5M, Na₂EDTA-100mM 10mM, HEPES-1M 100mM) e HM em quantidade suficiente para 4,5 ml. Esse preparado foi ultra centrifugado por 30 minutos a 36.000 x g em ultracentrífuga Beckman com o rotor 50Ti

ou equivalente com rotor de ângulo fixo, em temperatura de 0 °C a 4 °C. As frações foram separadas a cada 400 µl e alocadas em tubos de ultracentrífugas para a última etapa de ultracentrifugação por 2 horas a 100.000 x g em temperatura de 0 °C a 4 °C. Protocolo adaptado de (Graham, 2000).

3.24 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas sobre os resultados obtidos foram realizadas usando os pacotes estatísticos para Windows *GraphPad Prism* versão 6.01 e versão 10.2.3, GraphPad *Software*, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) bidirecional, emparelhada ou não emparelhada. Os dados foram apresentados como média $\pm$ SEM. Significância definida como $p < 0,05$.

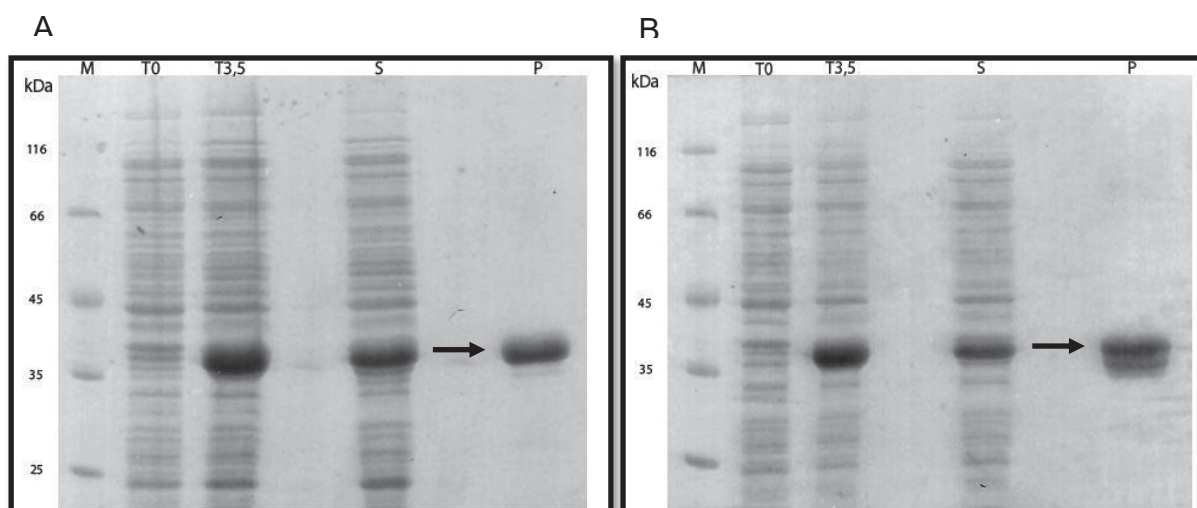
4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE *LOXOSCELES INTERMEDIA*

O desenvolvimento dos itens 3.2, 3.3 e 3.4 da seção “Material e Métodos”, que detalham a expressão das proteínas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, resultou nos dados apresentados na FIGURA 7. Esses resultados mostram que, após o processo de purificação das toxinas por cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA agarose e a subsequente corrida eletroforética, é possível verificar a qualidade das amostras purificadas.

Nos quadrantes A e B, os marcadores de massa molecular estão indicados por "M". Após a indução da expressão proteica utilizando 0,05 mM de IPTG a 30 °C por 3 horas e 30 minutos, foi possível observar a presença de uma banda mais intensa próxima a 35 kDa no gel A (LiRecDT1, toxina ativa) e no gel B (LiRecDT1 H12A, toxina mutada). Os tempos inicial e final da expressão proteica, indicados por "T0" e "T3,5", respectivamente, são acompanhados pelas amostras representadas por "S", que correspondem às frações solúveis obtidas após a lise das bactérias. As setas em "P" indicam que ambas as toxinas recombinantes foram obtidas com alto grau de pureza.

Figura 7. Análise por SDS/PAGE 15% sob condições redutoras das expressões da LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A em meio LB líquido a 30°C utilizando a cepa de *e. coli* BL21(DE3)pLysS.



Legenda: A – SDS-PAGE 15% redutor mostrando as amostras da proteína recombinante LiRecDT1; B – SDS-PAGE 15% redutor mostrando as amostras da proteína recombinante LiRecDT1 H12A. Em A e B os marcadores de massa molecular são representados por M. T0 indica a cultura bacteriana em LB líquido com densidade óptica entre 0,4 e 0,6. T3,5 representa a cultura após adição de 0,05 mM de IPTG com crescimento durante 3h30 a 30°C evidenciando a presença de uma banda mais intensa em relação ao início da expressão na altura próxima a 35 kDa. As amostras relativas às frações solúveis, "S", foram obtidas após a lise das bactérias. Amostras identificadas como "P" mostram as proteínas

após o processo de purificação com a utilização de cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA agarose, indicando um bom nível de pureza.

Fonte: A autora (2019).

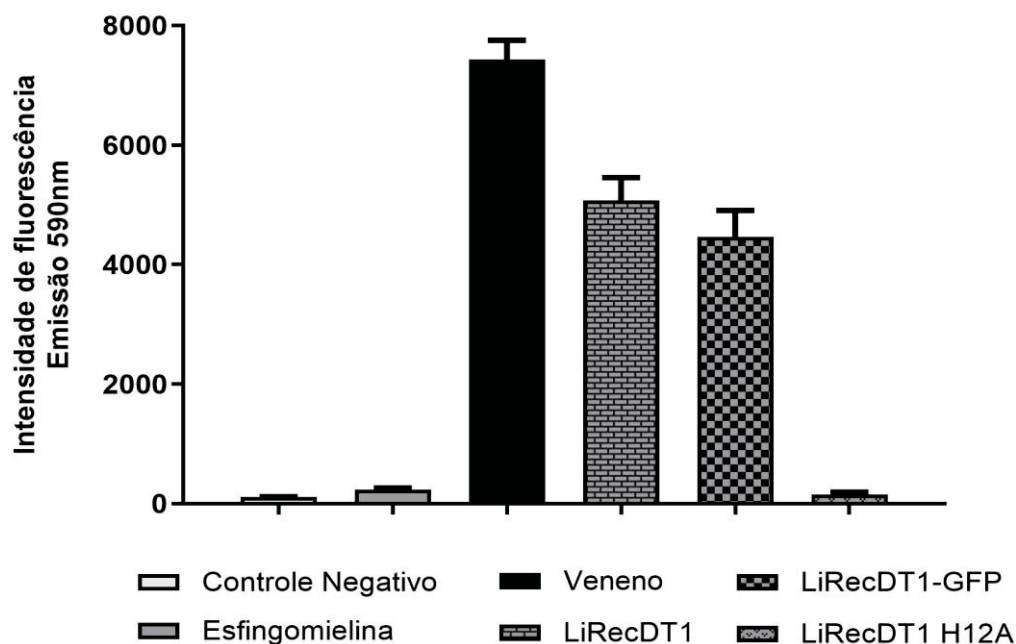
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES

As toxinas recombinantes utilizadas neste trabalho, LiRecDT1, LiRecDT1-GFP e LiRecDT1 H12A, foram avaliadas quanto à sua atividade enzimática utilizando o *kit* Amplex Red® para detecção indireta da liberação de colina, conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 da seção “Material e Métodos”.

Conforme os dados obtidos e plotados no GRÁFICO 1, as três enzimas e o veneno foram capazes de hidrolisar a esfingomielina após 30 minutos de reação, em diferentes níveis. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Chaim et al. (2011a) e permitem a utilização da enzima LiRecDT1, que é dermonecrótica ativa, da LiRecDT1 H12A, que é mutada com atividade enzimática residual, e da LiRecDT1-GFP, como ativa. Vale ressaltar que a toxina recombinante expressa com GFP apresenta atividade enzimática reduzida, possivelmente devido à massa molecular aumentada, já que a toxina loxoscélica e a GFP têm massas moleculares similares. Assim, a proteína de tamanho maior pode influenciar o acesso aos fosfolipídios de membrana.

Por apresentarem os resultados enzimáticos esperados, todas ficaram aptas para serem utilizadas para produção de anticorpos e sobre células, avaliando suas interações com membrana celular, respostas metabólicas, ativação de morte celular e expressão gênica.

Gráfico 1. Ensaio da atividade fosfolipásica do veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes.



Legenda: Atividade enzimática do veneno total de *Loxosceles intermedia* 10 µg, fosfolipases-D recombinantes 10 µg purificadas utilizando o *kit* Amplex® Red para detecção indireta da liberação de colina. Como controle negativo, foi utilizado o mix do *kit* para avaliar a fluorescência de fundo, além do mix acrescido de esfingomielina. A fluorescência decorrente do produto da reação foi determinada por espectrofluorimetria com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm. Os dados são apresentados como média ± SEM de pelo menos três experimentos realizados em triplicata. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) bidirecional não emparelhada. A análise estatística foi efetuada utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). Significância definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

4.3 VIABILIDADE CELULAR POR QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP

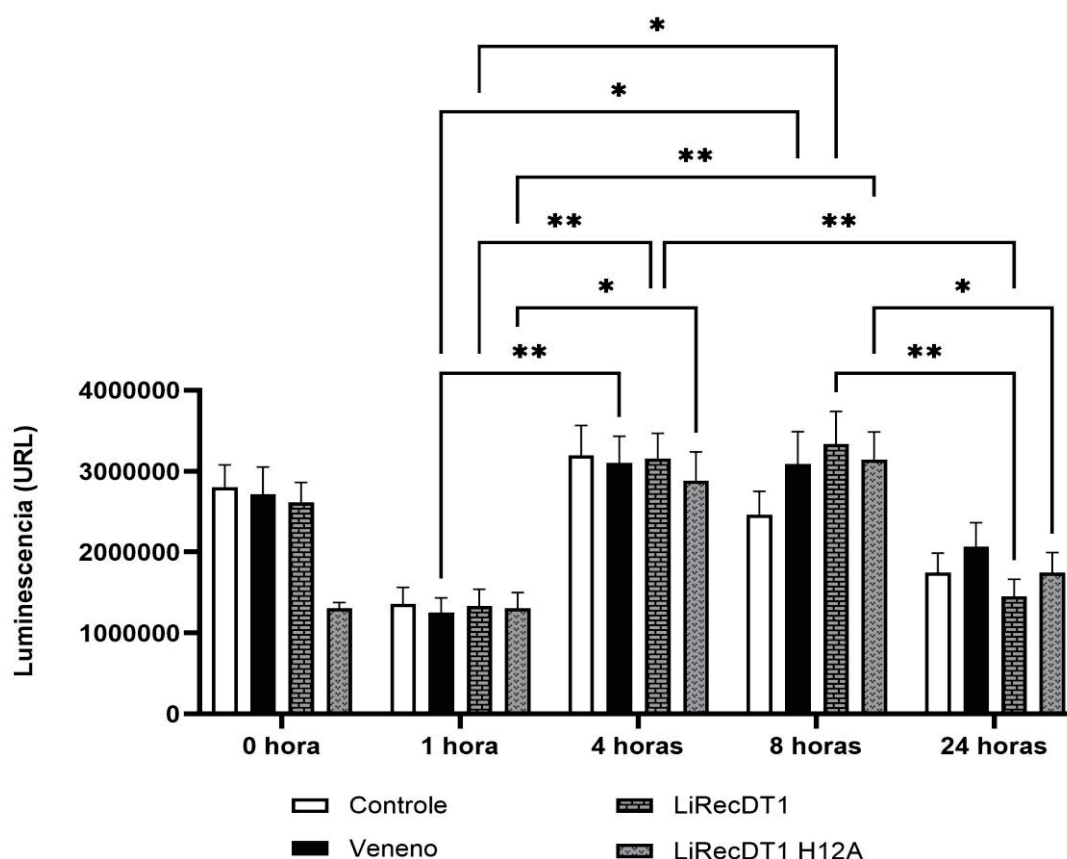
Para realizar a quantificação dos níveis de ATP, foi utilizado um *kit* luminescente conforme o itens 3.7, 3.8 e 3.12 da seção “Material e Métodos”, após a incubação da linhagem HaCaT sob diferentes condições. Por se tratar de uma linhagem sobre a qual pouco se sabe acerca da ação do veneno total de *Loxosceles intermedia* e das fosfolipases-D recombinantes, essas células foram utilizadas com diferentes densidades e incubadas com diferentes concentrações de veneno total e toxinas recombinantes, como ensaios-piloto para posterior definição da concentração a ser trabalhada.

O GRÁFICO 2 apresenta a quantificação de ATP a partir da luminescência mensurada após a exposição das células ao veneno total de *Loxosceles intermedia* 5 µg/ml, LiRecDT1 5 µg/ml e LiRecDT1 H12A 5 µg/ml, nos tempos de 0 hora, 1 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Além dos resultados mencionados abaixo, outras

diferenças estatisticamente significativas foram observadas em algumas comparações específicas e estão apresentadas no Anexo I, TABELA 2. Essas diferenças não foram o principal foco da nossa análise e, portanto, não são detalhadas nos GRÁFICOS 2 e 3. O foco principal foi dirigido para os efeitos do fator tempo, com cada condição analisada isoladamente.

Conforme evidenciado, os queratinócitos incubados com veneno total 5 µg/ml demonstraram um aumento estatisticamente significativo no ATP das células de 1 hora para 4 horas e de 1 hora para 8 horas. Isso indica claramente um aumento no metabolismo celular de forma dependente do tempo, podendo ser uma resposta adaptativa inicial ao estresse, notada logo nas primeiras horas, quando as células aumentam sua produção de ATP para tentar manter a homeostase.

Gráfico 2. Níveis de ATP liberados por queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, nos tempos 0 hora, 1 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas.



Legenda: Queratinócitos humanos da linhagem HaCaT foram expostos ao controle, ao veneno total de *Loxosceles intermedia* 5 µg/ml, LiRecDT1 5 µg/ml e LiRecDT1 H12A 5 µg/ml por 0 hora, 1 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Os níveis de ATP foram mensurados pelo kit CellTiter-Glo® através de luminescência. Os dados são apresentados como média ± SEM de pelo menos três experimentos realizados em triplicata. A análise dos dados foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada,

seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA). Significância definida como $p < 0,05$.
Fonte: A autora (2024).

As incubações com LiRecDT1 5 $\mu\text{g/ml}$ mostraram um aumento estatisticamente significativo no ATP das células de 1 hora para 4 horas e de 1 hora para 8 horas, assim como as células incubadas com veneno. Os valores de ATP em 4 horas e em 8 horas foram maiores que os de 24 horas, havendo diferença estatisticamente significativa nessa diminuição. É possível que haja uma resposta inicial das células ao estresse, refletindo em um aumento na atividade metabólica em resposta à ação da toxina, com um dano considerável à célula a partir de 24 horas.

As incubações com LiRecDT1 H12A 5 $\mu\text{g/ml}$ também demonstraram um aumento estatisticamente significativo no ATP das células de 1 hora para 4 horas e de 1 hora para 8 horas. Os valores de ATP caíram com diferença estatisticamente significativa entre 8 horas e 24 horas de incubação. É possível que haja uma resposta inicial das células ao estresse, refletindo em um aumento na atividade metabólica em resposta à ação da toxina, com um dano considerável à célula a partir de 24 horas, mesmo que essa toxina apresente atividade enzimática comprovadamente diminuída.

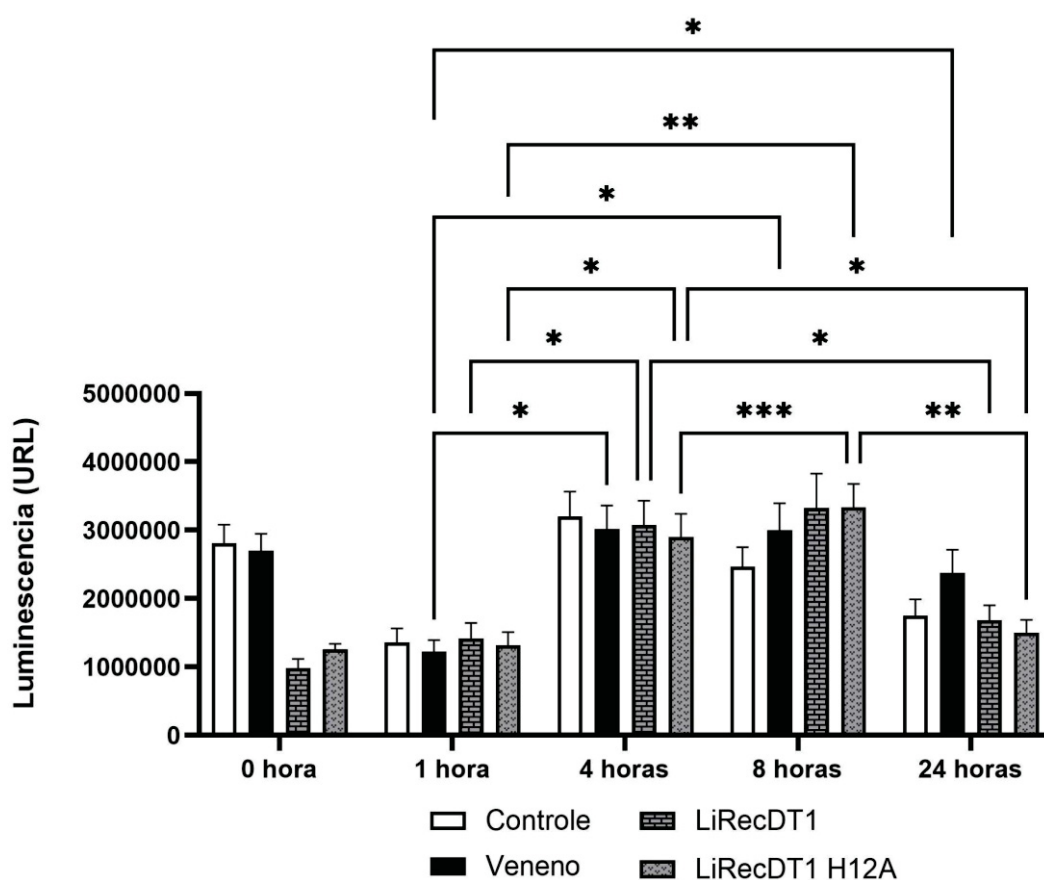
O GRÁFICO 3 apresenta a quantificação de ATP a partir da luminescência mensurada após a exposição das células ao veneno total de *Loxosceles intermedia* 10 $\mu\text{g/ml}$, LiRecDT1 10 $\mu\text{g/ml}$ e LiRecDT1 H12A 10 $\mu\text{g/ml}$, nos tempos de 0 hora, 1 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Conforme evidenciado, nos queratinócitos incubados com veneno total 10 $\mu\text{g/ml}$, foi possível observar um aumento estatisticamente significativo no ATP de 1 hora para 8 horas, indicando uma resposta adaptativa inicial ao estresse, notada logo nas primeiras horas, quando as células aumentam sua produção de ATP para tentar manter a homeostase. Além disso, ao comparar 1 hora de incubação com 24 horas, há um aumento na atividade metabólica, embora graficamente o tempo de 24 horas apareça reduzido em relação ao de 8 horas, o que pode ser uma alteração prévia à morte celular.

Nas células incubadas com LiRecDT1 10 $\mu\text{g/ml}$, houve um aumento estatisticamente significativo na quantidade de ATP de 1 hora para 4 horas. Assim como nas células incubadas com veneno total, é possível que haja uma resposta inicial das células ao estresse, refletindo um aumento na atividade metabólica em resposta ao dano celular induzido pela toxina. Considerando a mudança de comportamento celular de 4 horas para 24 horas, em que há uma diminuição na

quantidade de ATP mensurada, essa alteração pode também ser uma fase prévia à morte celular.

As células incubadas com LiRecDT1 H12A 10 µg/ml demonstraram um aumento na quantidade de ATP de 1 hora para 4 horas e de 1 hora para 8 horas. Assim como os resultados da toxina recombinante e do veneno, esses resultados sugerem uma resposta inicial das células ao estresse causado pela toxina mutada, mesmo que sua atividade enzimática seja comprovadamente diminuída. A partir de 4 horas de incubação, comparando os valores com os de 24 horas, é possível identificar uma diminuição significativa de ATP, assim como entre 8 horas e 24 horas. Novamente, pode ser que a toxina mutada também esteja causando nas células alterações que indiquem morte celular a partir de 24 horas. No Anexo I, TABELA 3, todas as diferenças estatisticamente significativas estão evidenciadas.

Gráfico 3. Níveis de ATP liberados pelos queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes nos tempos de 0 hora, 1 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas.



Legenda: Queratinócitos humanos da linhagem HaCaT foram expostos ao controle, veneno total de *Loxosceles intermedia* 10 µg/ml, LiRecDT1 10 µg/ml e LiRecDT1 H12A 10 µg/ml por 0 hora, 1 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Os níveis de ATP foram mensurados pelo kit CellTiter-Glo® através de luminescência. Os dados são apresentados como média ± SEM de, pelo menos, três experimentos

realizados em triplicata. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad *Software*, Boston, Massachusetts, EUA). Significância definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

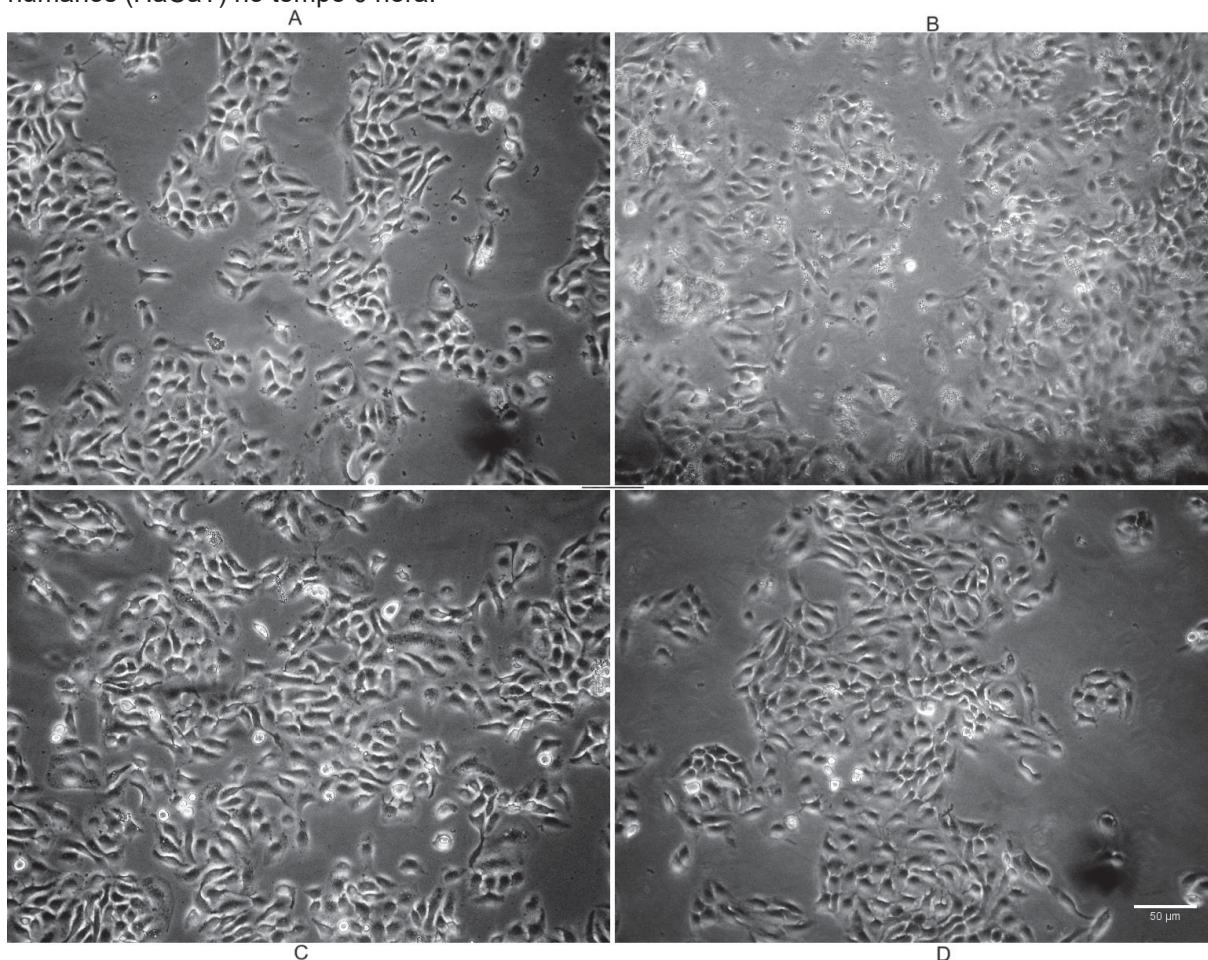
4.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS HUMANOS POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

Para realizar a análise da morfologia celular por microscopia de luz em microscópio invertido, foram aplicados os itens 3.7, 3.8 e 3.13 da seção “Material e Métodos”. Foram plaqueadas 220.000 células por poço da linhagem de queratinócitos humanos HaCaT, em placa de 6 poços. Após subcultivo com 48 horas de crescimento, os queratinócitos foram incubados sob diferentes condições como meio DMEM sem suplementação como controle, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml, em ensaios realizados em duplicata nos tempos de 0 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Para seleção das imagens, foram realizados três ensaios independentes, em duplicata.

As consequências da ação do veneno foram observadas através das FIGURAS 8 a 11, quadrante B; as da toxina recombinante estão nas FIGURAS 8 a 11, quadrante C; e as da toxina recombinante mutada nas FIGURAS 8 a 11, quadrante D.

A FIGURA 8 mostra o padrão morfológico das células da linhagem HaCaT imediatamente ao serem incubadas com as diferentes condições. A partir da adição das toxinas e do veneno às células, todos na concentração de 25 µg/ml, as alterações morfológicas foram sendo acompanhadas e registradas.

Figura 8. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre queratinócitos humanos (HaCaT) no tempo 0 hora.

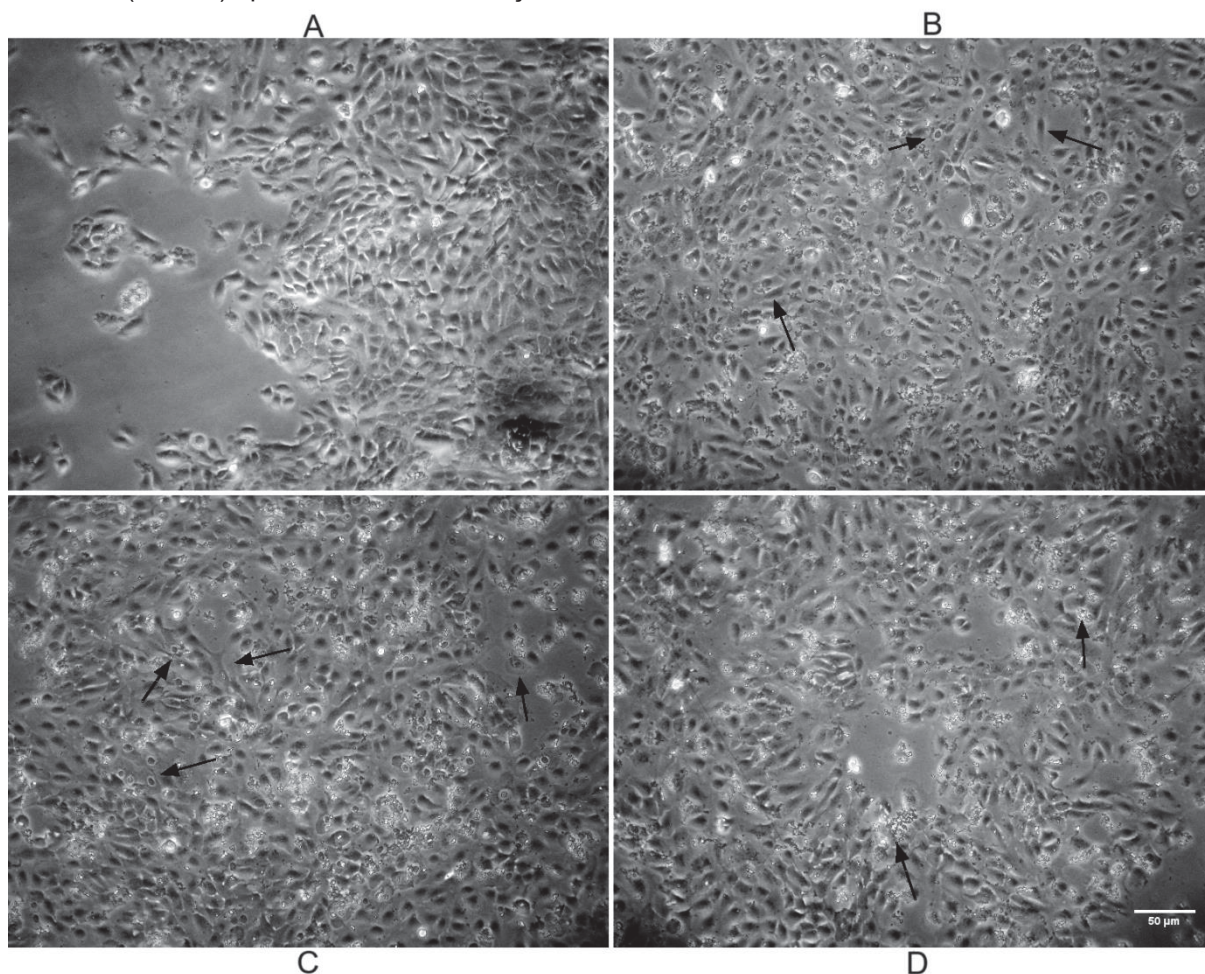


Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) no tempo 0 hora da incubação com (A) controle, (B) veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml e toxinas recombinantes (C) LiRecDT1 25 µg/ml e (D) LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. As imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido Leica DM IL, com uma câmera digital Sony CyberShot 7.2 Mega Pixels acoplada, com zoom frontal 2.0 e prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm.

Fonte: A autora (2024).

Após 2 horas de incubação, conforme mostrado na FIGURA 9, observamos leves alterações morfológicas no quadrante B, onde o veneno causou início de retração citoplasmática e presença de fragmentos celulares. No quadrante C, as células tratadas com a toxina LiRecDT1 exibiram um padrão semelhante de alteração, com núcleos mais escuros e poucas células apresentando citoplasma alongado. Comparando com as imagens do controle, há um aumento aparente na quantidade de fragmentos celulares. No quadrante D, embora em menor quantidade, também houve um aumento de fragmentos celulares em comparação com a imagem do controle e do tratamento com LiRecDT1. As alterações foram indicadas por setas.

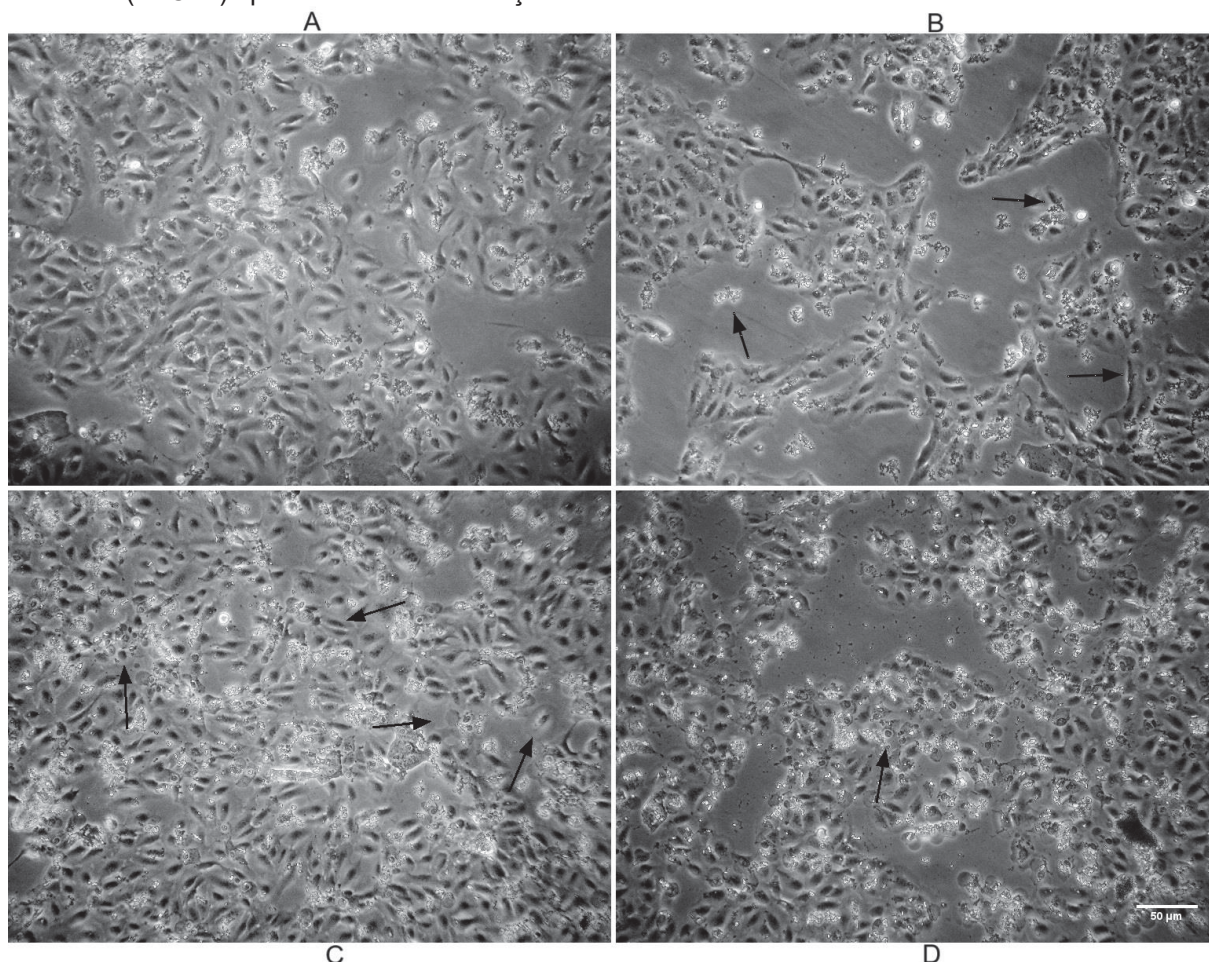
Figura 9. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre queratinócitos humanos (HaCaT) após 2 horas de incubação.



Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) após 2 horas de incubação com (A) controle, (B) veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, e toxinas recombinantes (C) LiRecDT1 25 µg/ml e (D) LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. As imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido Leica DM IL, com uma câmera digital Sony CyberShot 7.2 Mega Pixels acoplada, com *zoom* frontal 2.0 e prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm.
Fonte: A autora (2024).

Após 4 horas de incubação, conforme mostrado na FIGURA 10, o quadrante B revelou que a ação do veneno resultou em uma diminuição na confluência celular, com as células restantes organizadas em ilhas, apresentando citoplasma alongado e fragmentos celulares. No quadrante C, os queratinócitos incubados com a toxina LiRecDT1 exibiram um padrão persistente de alterações, com um aumento adicional de fragmentos celulares. No quadrante D, as células incubadas com a toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A apresentaram fragmentos celulares, além de alterações morfológicas, como retração citoplasmática, citoplasma mais claro que o núcleo e várias células arredondadas.

Figura 10. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre queratinócitos humanos (HaCaT) após 4 horas de incubação.



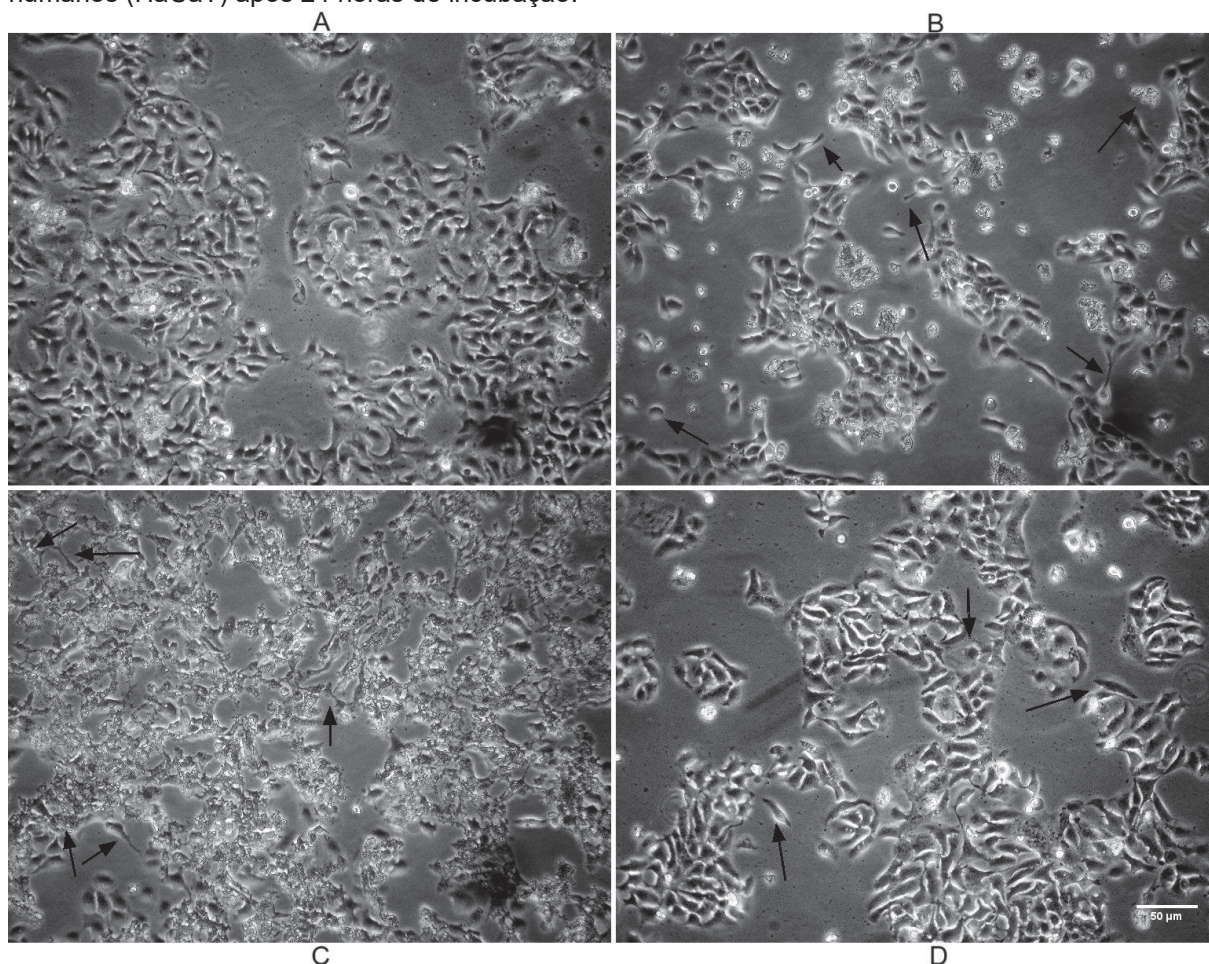
Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) após 4 horas de incubação com (A) controle, (B) veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, e toxinas recombinantes (C) LiRecDT1 25 µg/ml e (D) LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. As imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido Leica DM IL, com uma câmera digital Sony CyberShot 7.2 Mega Pixels acoplada, com zoom frontal 2.0 e prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm.

Fonte: A autora (2024).

Após 24 horas de incubação, conforme mostrado na FIGURA 11, as alterações morfológicas nos queratinócitos incubados com veneno total, quadrante B, evidenciaram a presença de células descoladas da placa, em formato esférico e com alta refringência, além de fragmentos celulares adicionais. Essas alterações ocorreram de forma progressiva e dependente do tempo. No quadrante C, a toxina LiRecDT1 gerou uma quantidade significativa de fragmentos celulares e alterações na morfologia citoplasmática, com células apresentando formatos variados entre alongado e arredondado; nas células arredondadas, os núcleos eram mais escuros e o citoplasma mais claro. No quadrante D, a toxina recombinante LiRecDT1 H12A resultou em células alongadas, algumas com citoplasma arredondado, células

descoladas e organização do cultivo em ilhas. As alterações observadas foram muito semelhantes às do quadrante B, incubado com veneno, após 24 horas.

Figura 11. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre queratinócitos humanos (HaCaT) após 24 horas de incubação.



Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) após 24 horas de incubação com (A) controle, (B) veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, (C) toxina recombinante LiRecDT1 25 µg/ml, e (D) toxina recombinante LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. As imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido Leica DM IL, com uma câmera digital Sony CyberShot 7.2 Mega Pixels acoplada, com zoom frontal 2.0 e prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm. Fonte: A autora (2024).

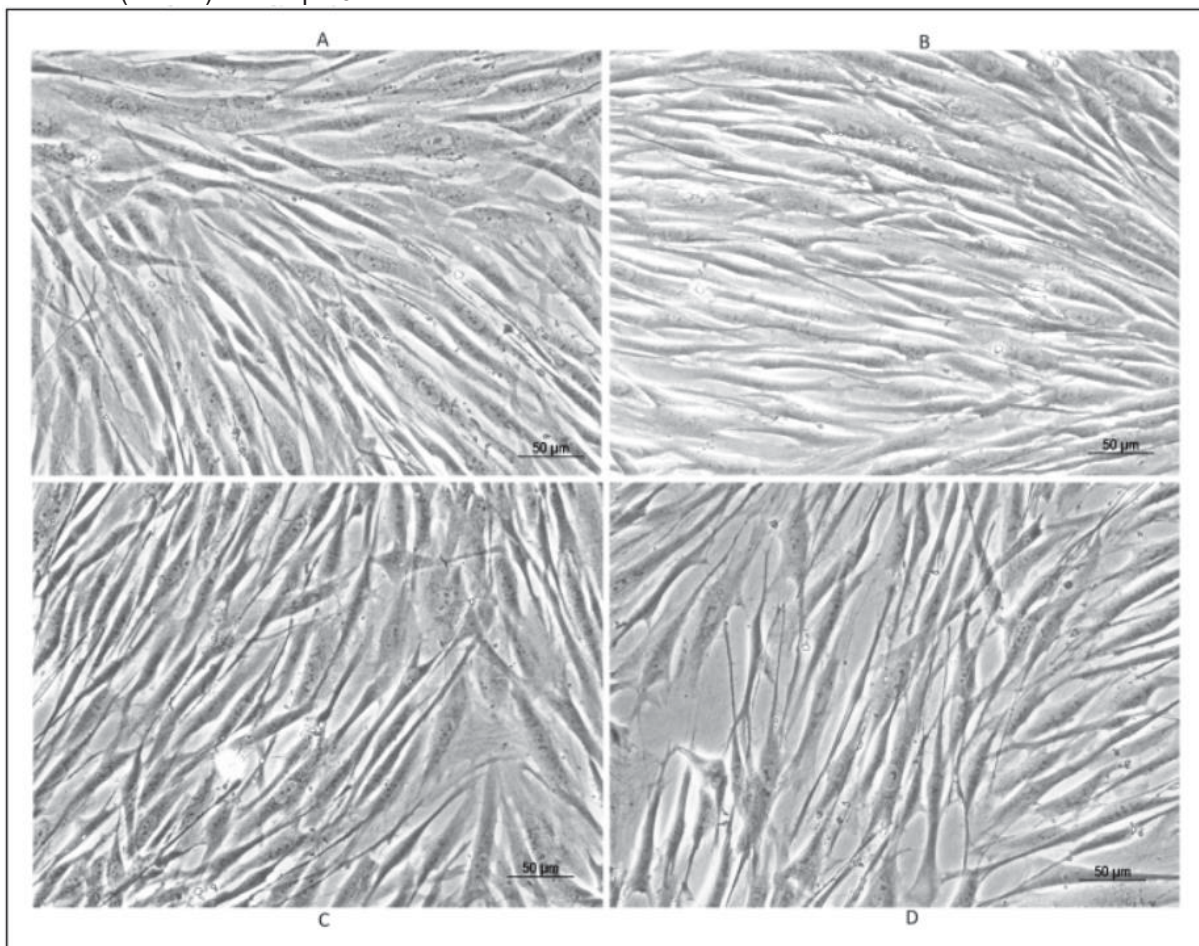
Por não termos, nessa metodologia, um acontecimento bioquímico definido, essas mudanças morfológicas ao longo do tempo são sugestivas de comprometimento da integridade celular, indicando possível indução de morte celular, conforme indicado em literatura (Kroemer et al., 2009).

Também foi realizada a análise utilizando a linhagem de fibroblastos humanos HFF-1, conforme itens 3.7, 3.8 e 3.13 da seção “Material e Métodos”, com plaqueamento de 220.000 células por poço, em duplicata utilizando placas de 6 poços. Após subcultivo com 48 horas de crescimento, as células foram incubadas com meio

DMEM sem suplementação como controle, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml, nos tempos de 0 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Para seleção das imagens, foram realizados três ensaios independentes, em duplicata.

A FIGURA 12, apresenta o padrão morfológico da linhagem HFF-1 no tempo 0 hora das condições estudadas, evidenciando que não há diferenças morfológicas entre as células. A partir da adição das toxinas e do veneno às células, todos na concentração de 25 µg/ml, as alterações morfológicas foram sendo acompanhadas e registradas.

Figura 12. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre fibroblastos humanos (HFF-1) no tempo 0 hora.

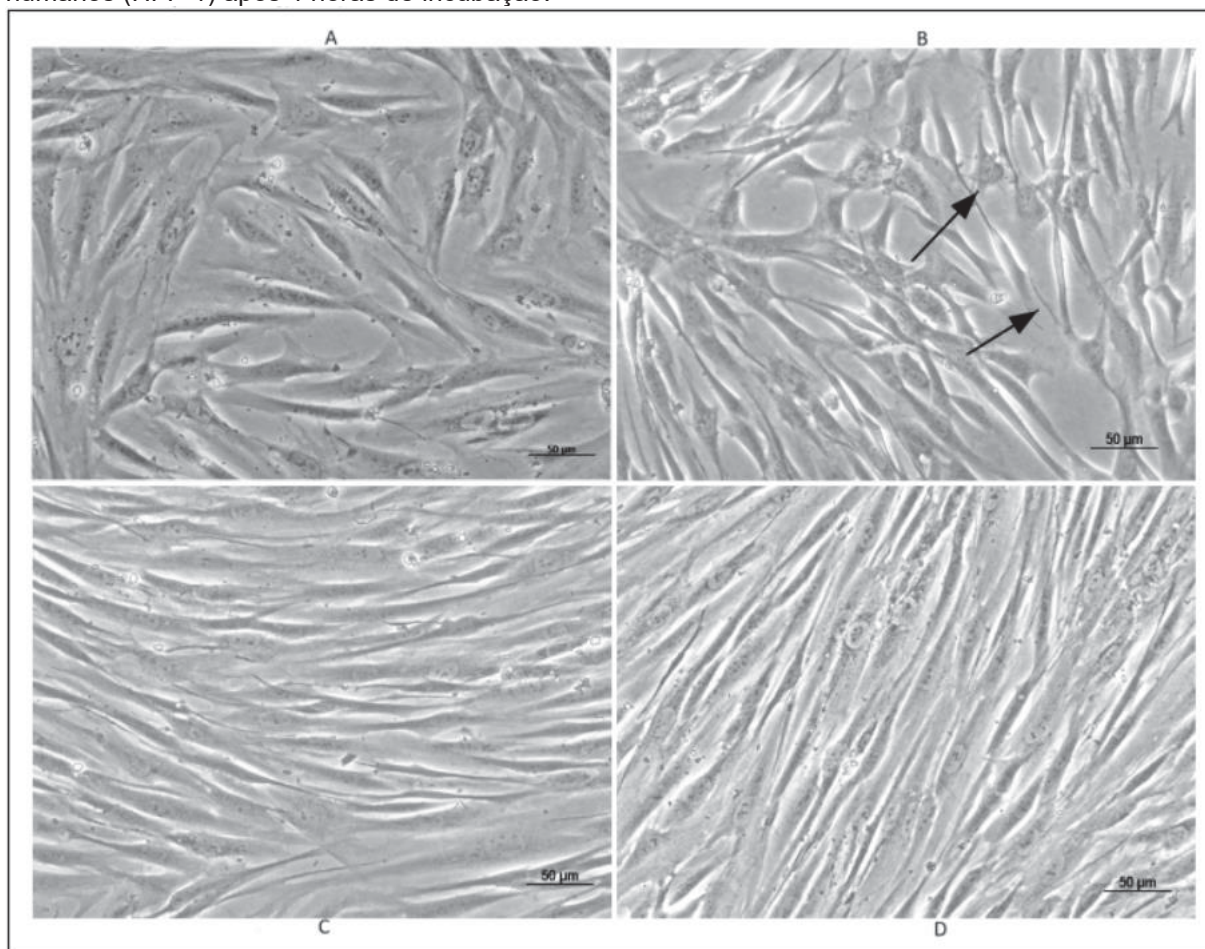


Legenda: Imagens de fibroblastos humanos (HFF-1) após 0 horas de incubação com controle (A), veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml (B), toxina recombinante LiRecDT1 25 µg/ml (C) e toxina recombinante LiRecDT1 H12A 25 µg/ml (D). As imagens foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência Zeiss e a prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm.

Fonte: A autora (2019).

Ao examinar a ação do veneno total sobre essa linhagem, as primeiras alterações foram observadas após 4 horas de incubação, conforme mostrado na FIGURA 13, quadrante B, com mudanças morfológicas incluindo retração citoplasmática e arredondamento das células. No quadrante C, não há alterações morfológicas aparentes causadas pela toxina recombinante LiRecDT1, bem como no quadrante D, com a toxina LiRecDT1 H12A.

FIGURA 13. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre fibroblastos humanos (HFF-1) após 4 horas de incubação.



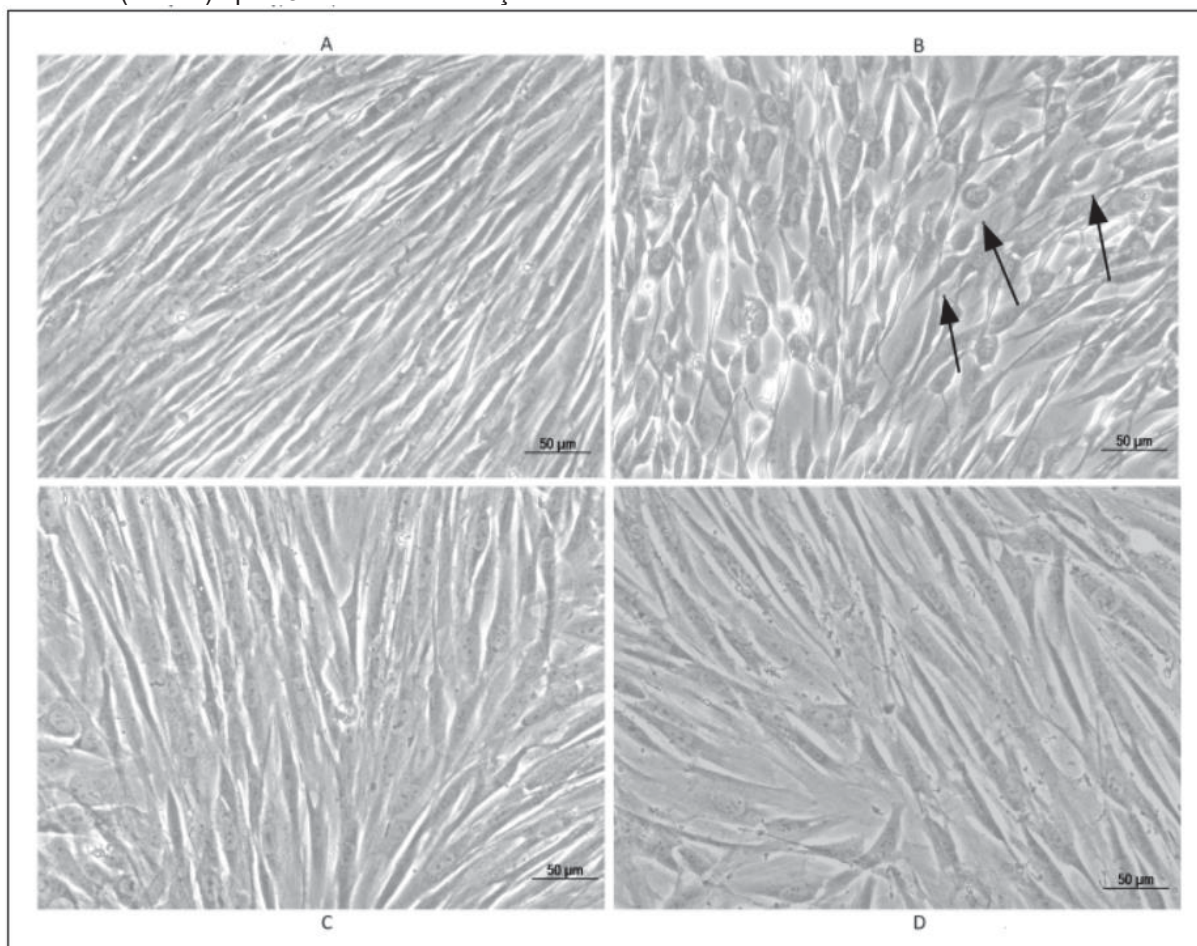
Legenda: Imagens de fibroblastos humanos (HFF-1) após 4 horas de incubação com (controle (A), veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml (B), toxina recombinante LiRecDT1 25 µg/ml (C) e toxina recombinante LiRecDT1 H12A 25 µg/ml (D). As imagens foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência Zeiss e a prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm.

Fonte: A autora (2024).

Após 8 horas de incubação com veneno total, a FIGURA 14 quadrante B, demonstra que houve um aumento na quantidade de células com alterações morfológicas, com uma maior distinção entre as regiões citoplasmática e nuclear devido à retração da membrana. No quadrante C e D, as células com a toxina

LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A respectivamente, continuam sem alterações morfológicas visíveis.

Figura 14. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre fibroblastos humanos (HFF-1) após 8 horas de incubação.



Legenda: Imagens de fibroblastos humanos (HFF-1) após 8 horas de incubação com controle (A), veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml (B), toxina recombinante LiRecDT1 25 µg/ml (C) e toxina recombinante LiRecDT1 H12A 25 µg/ml (D). As imagens foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência Zeiss e a prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm.

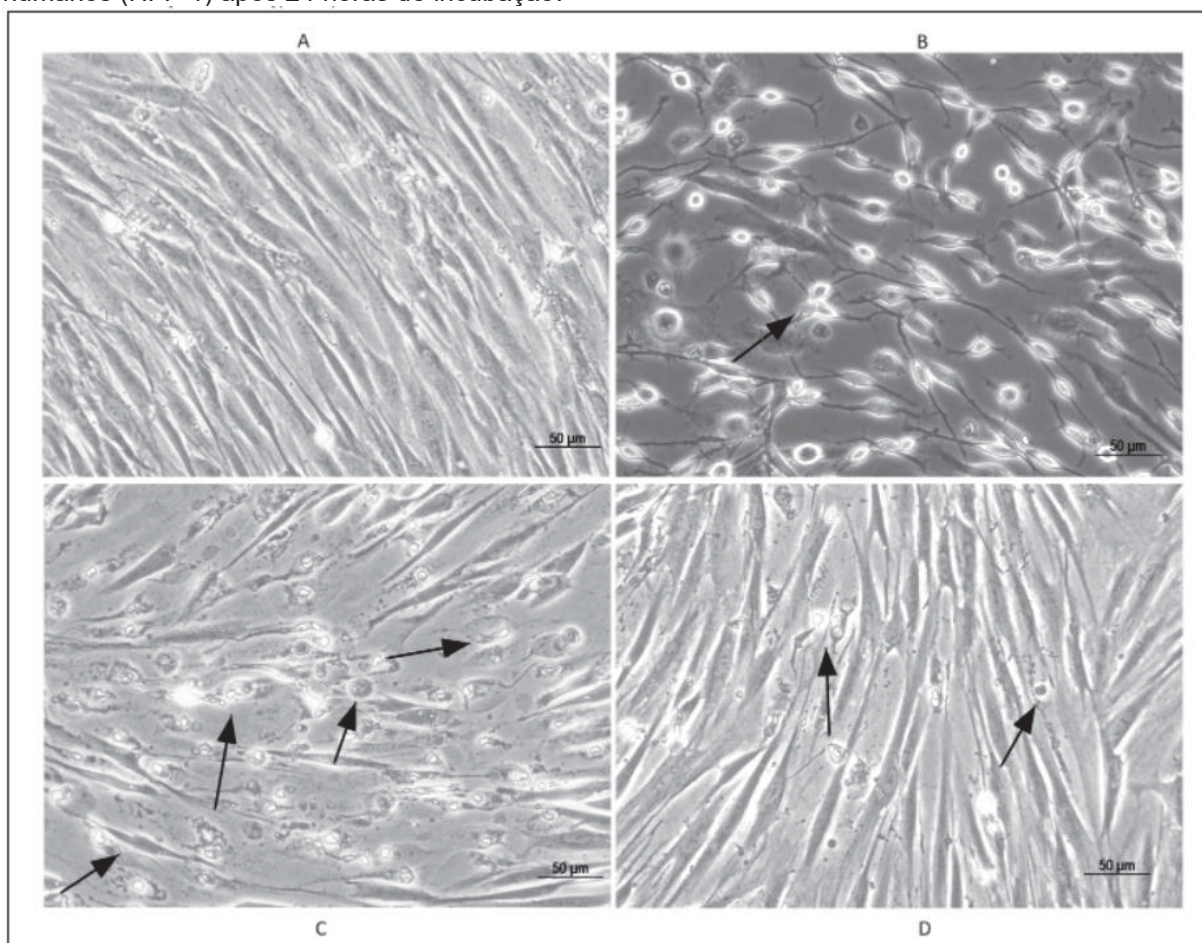
Fonte: A autora (2024).

Após 24 horas de incubação, conforme mostrado na FIGURA 15, as alterações morfológicas nos fibroblastos incubados com veneno total, quadrante B, evidenciaram a maioria das células apresentando morfologia alterada e sinais de descolamento celular, indicados pelo aumento da refração da luz nas regiões centrais das células. Essas alterações ocorreram de forma progressiva e dependente do tempo. No quadrante C, a toxina LiRecDT1 evidenciou uma diferença considerável no cultivo, com presença de fragmentos celulares e alterações na morfologia citoplasmática com retração. As células apresentaram formatos variados, entre

alongados e arredondados, além de muitas células descoladas. No quadrante D, as alterações morfológicas e os danos observados tiveram uma resposta tardia e de menor intensidade, quando comparados à toxina ativa e ao veneno total. Por outro lado, continua a corroborar a literatura (Chaim et al., 2011a) indicando que, embora a atividade enzimática dessa toxina seja reduzida, sua ação sobre as células ainda é danosa.

As alterações morfológicas observadas, baseadas nas definições do Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular, sugerem comprometimento da integridade celular e possíveis alterações metabólicas, indicando a ativação do processo de morte celular (Kroemer et al., 2009).

Figura 15. Efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* e das toxinas recombinantes sobre fibroblastos humanos (HFF-1) após 24 horas de incubação.



Legenda: Imagens de fibroblastos humanos (HFF-1) após 24 horas de incubação com controle (A), veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml (B), toxina recombinante LiRecDT1 25 µg/ml (C) e toxina recombinante LiRecDT1 H12A 25 µg/ml (D). As imagens foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência Zeiss e a prancha montada pelo software ImageJ 1.54f. Barra de escala equivalente a 50 µm.

Fonte: A autora (2024).

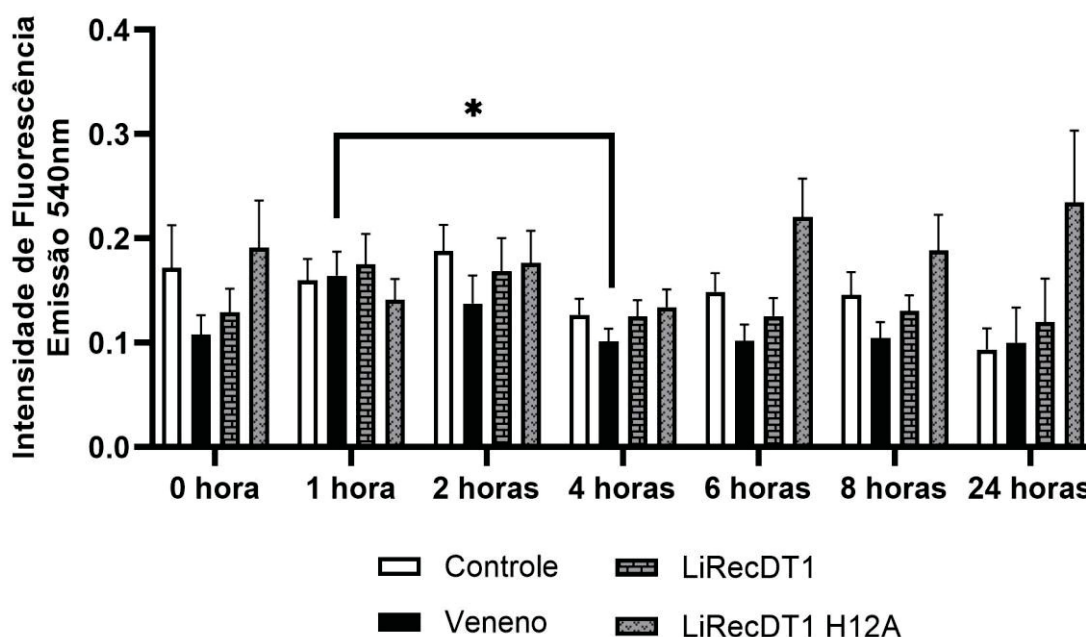
4.5 ANÁLISE DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO POR QUERATINÓCITOS HUMANOS

Para realizar o ensaio de captação do Vermelho Neutro nas células viáveis, conforme itens 3.7, 3.8 e 3.14 da seção “Material e Métodos” foram plaqueadas 15.000 células por poço da linhagem HaCaT.

No GRÁFICO 4, os níveis de vermelho neutro capturados pelos queratinócitos humanos HaCaT estão indicados pela intensidade de fluorescência. Foi verificada uma diminuição estatisticamente significativa na captação de vermelho neutro pelas células que foram incubadas com veneno total de *Loxosceles intermedia*, do tempo de 1 hora de incubação para 4 horas de incubação. Além das comparações significativas não apontadas no gráfico, mas indicadas no Anexo I, TABELA 4, onde todas as diferenças estatisticamente significativas estão evidenciadas.

A alteração causada pelo veneno é sugestiva de perda de integridade celular, alteração de pH e essa diminuição pode ser atribuída ao aumento da atividade autofágica nestas células. Afinal, certas condições causam danos direto aos lisossomos, resultando na sua diminuição, pela ruptura de lisossomos e liberação de enzimas hidrolíticas no citoplasma (Mahapatra et al., 2021).

Gráfico 4. Níveis de vermelho neutro internalizado por queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, nos tempos 0 hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas e 24 horas.



Legenda: Queratinócitos humanos da linhagem HaCaT foram expostos ao controle, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml por 0 hora, 1 hora, 4

horas, 8 horas e 24 horas. A captação do vermelho neutro pela linhagem HaCaT foi mensurada através de espectrofotometria. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de, pelo menos, três experimentos efetuados em triplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). Significância definida como $p < 0,05$.
Fonte: A autora (2024).

4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT

Para a quantificação dos cristais de formazan, foram aplicados os itens 3.7, 3.8 e 3.15 da seção “Material e Métodos”. Foram avaliadas as possíveis alterações metabólicas, analisando se as condições às quais as células HaCaT e HFF-1 foram submetidas causaram citotoxicidade e a partir de quanto tempo em contato com as células houve alteração na viabilidade celular. Como controle, as células foram mantidas em meio sem soro, utilizando PBS como veículo, na ausência de quaisquer toxinas ou veneno.

Sabe-se que células viáveis, com desidrogenases celulares e metabolismo ativo são capazes de transformar um composto de coloração amarela, MTT, em um composto de coloração azul escuro/roxo chamado de formazan, que são mensurados por espectrofotometria. Assim sendo, a formação da cor serve como um marcador útil e conveniente para identificação de alterações em viabilidade celular ou mesmo citotoxicidade celular (Riss et al., 2004).

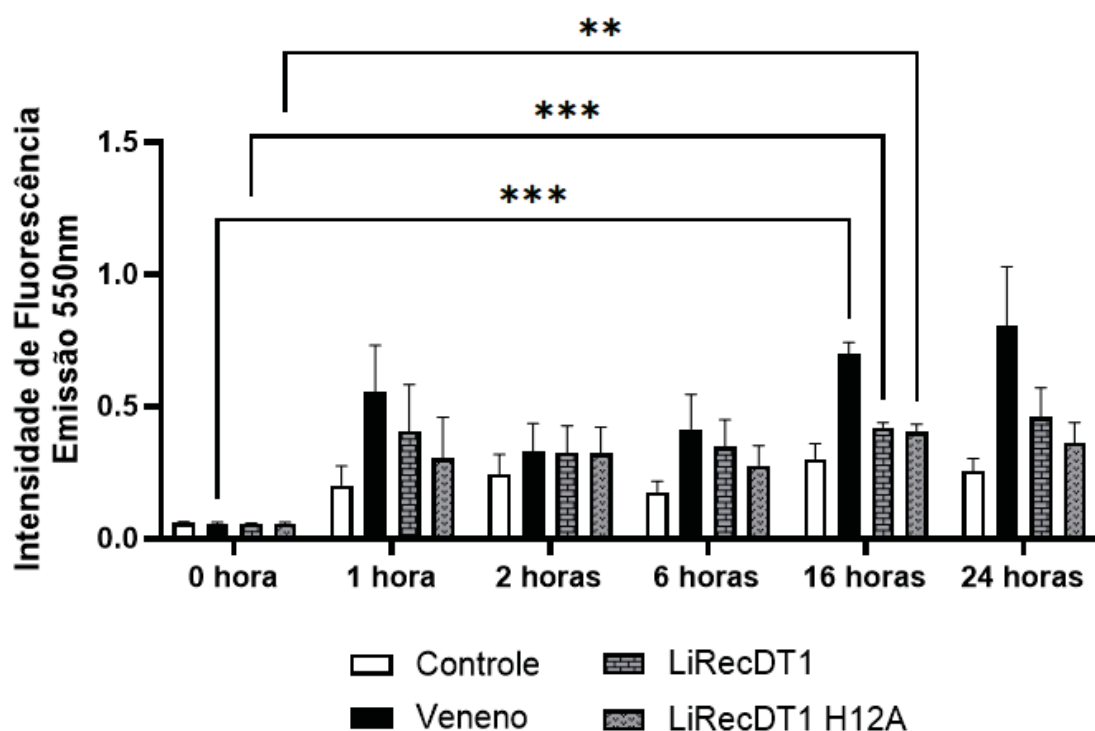
A redução do MTT pode ser mediada por enzimas oxidoredutases e desidrogenases, bem como por doadores de elétrons (principalmente NADPH) em diferentes estágios das vias glicolíticas até a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Além das mitocôndrias, a redução do MTT está associada ao citoplasma e às membranas não mitocondriais, incluindo o compartimento do endossomo/lisossomo e a membrana plasmática. A localização da formação de formazan e seu transporte intracelular são controversos, sendo observados grânulos de formazan em várias organelas, como o retículo endoplasmático, gotículas lipídicas citosólicas, membranas plasmáticas, núcleo e microssomas (Berridge; Herst; Tan, 2005).

Neste trabalho, os resultados do ensaio de MTT utilizando a linhagem de queratinócitos humanos HaCaT estão apresentados no GRÁFICO 5, e todas as diferenças estatísticas identificadas estão indicadas no Anexo I, TABELA 5. Foi possível confirmar que, após 16 horas da incubação com veneno total, há um aumento estatisticamente significativo na citotoxicidade celular. A citotoxicidade aumentada causada pelas PLDs estudadas também foi significativa no mesmo período de

incubação. O veneno total e LiRecDT1 apresentaram significância ainda maior que LiRecDT1 H12A. Essas alterações sustentam os resultados das análises morfológicas, nas quais foram observadas mudanças sugerindo distúrbios no metabolismo celular.

Mais uma vez, esse resultado corrobora com os resultados obtidos em outros anos pelo grupo que, aplicando veneno total e as PLD em pele, identificaram alterações que trouxeram a afirmação de a PLD sozinha ser capaz de causar a lesão dermonecrótica (Chaim et al., 2011a; Nguyen; Pandey, 2019).

Gráfico 5. Níveis de desidrogenase mitocondrial em queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, nos tempos de 0 hora, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas, utilizando o ensaio de MTT.



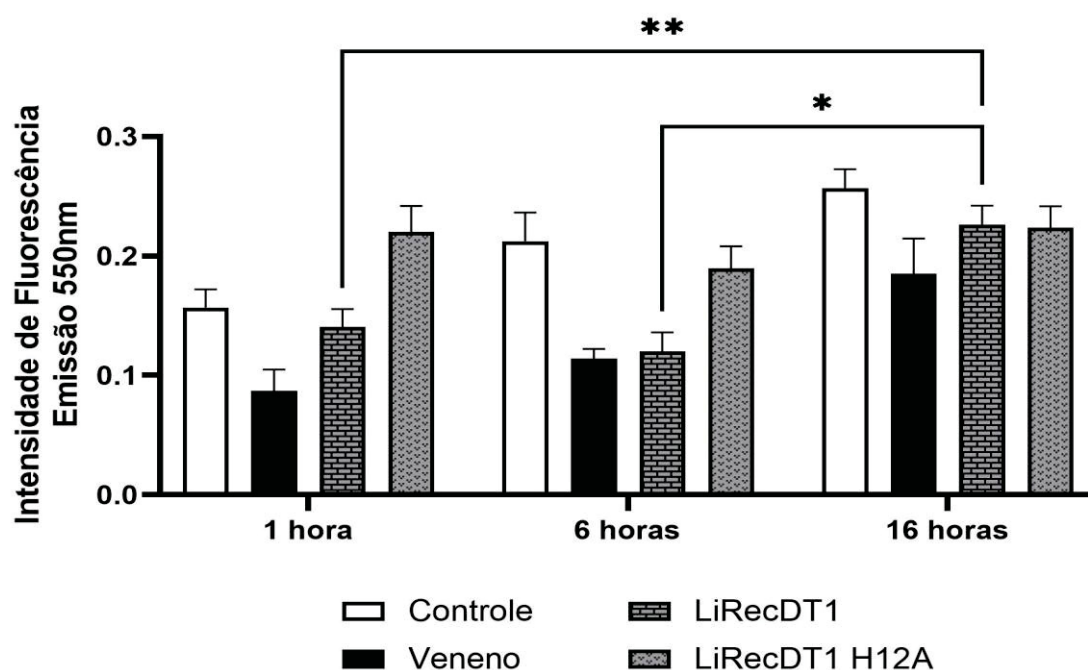
Legenda: Análise da atividade das desidrogenases mitocondriais em queratinócitos humanos (HaCaT) pelo método do MTT, sob condições controle e expostos ao veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml por 0 hora, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas de incubação. Os dados são apresentados como média ± SEM de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. A análise foi realizada por variância (ANOVA) bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). Significância definida como $p < 0,05$.
Fonte: A autora (2024).

Os resultados do ensaio de MTT utilizando a linhagem de fibroblastos humanos HFF-1 estão apresentados no GRÁFICO 6, e todas as diferenças estatísticas identificadas estão indicadas no Anexo I, TABELA 6. Foi possível notar uma diferença significativa na atividade da desidrogenase mitocondrial nas células

incubadas com LiRecDT1 tanto de 1 hora para 6 horas quanto de 6 horas para 16 horas de incubação. Esse aumento em 16 horas sustenta os resultados obtidos por microscopia de contraste de fase, que demonstrou alterações morfológicas detectadas apenas nas imagens obtidas após 24 horas de incubação com a toxina.

A literatura afirma a ação com efeito danoso da toxina ativa sobre diferentes linhagens celulares (Bertoni da Silveira et al., 2006; Chaim et al., 2006, 2011a, 2011b; Chaves-Moreira et al., 2017). Esse dado mostra que a ação danosa aos fibroblastos está, muito provavelmente, associada ao tempo aumentado de exposição a estas toxinas com a concentração utilizada.

Gráfico 6. Níveis de desidrogenase mitocondrial em fibroblastos humanos (HFF-1) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, nos tempos de 0 hora, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas, utilizando o ensaio de MTT.



Legenda: Análise da atividade das desidrogenases mitocondriais pelo método do MTT em fibroblastos humanos (HFF-1) expostos ao controle, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml por 1 hora, 6 horas e 16 horas de incubação. Os dados são apresentados como média ± SEM de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. A análise foi realizada por variância (ANOVA) bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). Significância definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

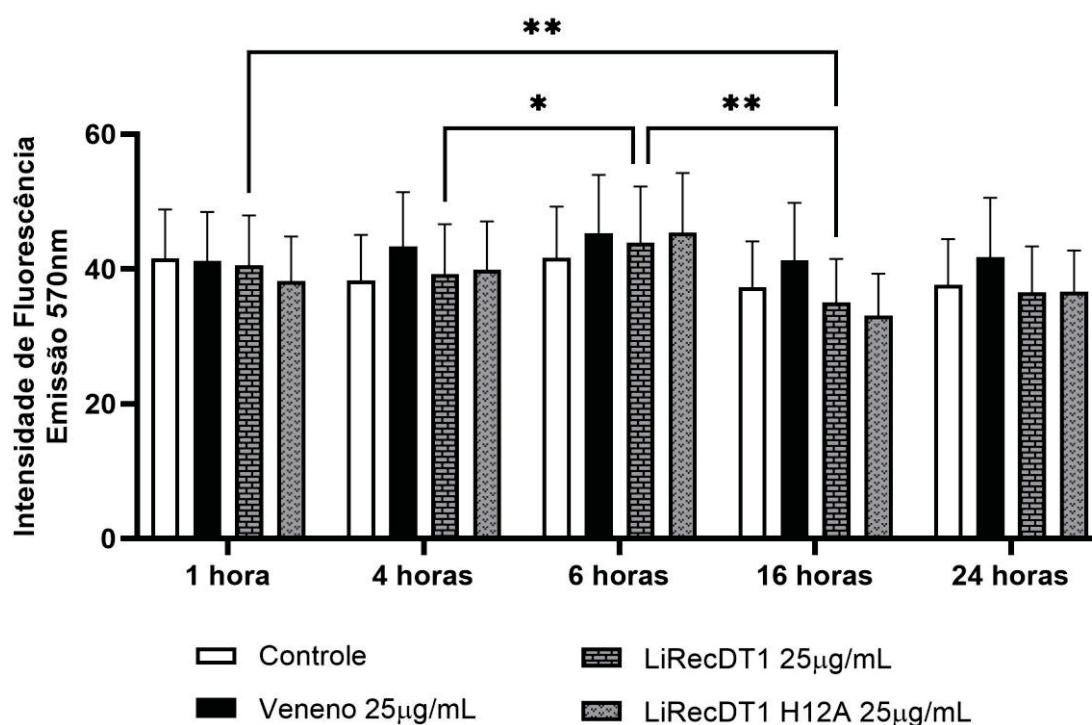
4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA

Para o ensaio de citotoxicidade celular pelo método de quantificação do corante Cristal Violeta, foram aplicados os itens 3.7, 3.8 e 3.16 da seção “Material e

Métodos”. O objetivo foi analisar a interferência do veneno total ou das toxinas recombinantes na resposta da linhagem HaCaT ao longo do tempo, nas condições estabelecidas.

O GRÁFICO 7 demonstra a resposta da linhagem HaCaT que ao longo do tempo evidenciou que a toxina recombinante LiRecDT1 25 µg/ml promove alterações significativas. A significância dos resultados de 4 horas a 6 horas evidencia que a toxina promove alterações celulares consideráveis, em poucas horas. Bem como o resultado que mostra a diferença entre 1 hora e 16 horas, aponta alterações cumulativas, sugestivas de alterações irreparáveis nos queratinócitos.

Gráfico 7. Níveis de citotoxicidade celular em queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, utilizando o corante cristal violeta.



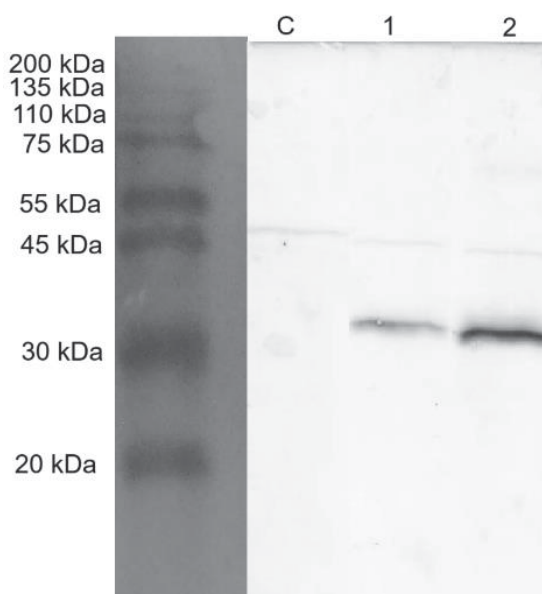
Legenda: Análise de citotoxicidade celular em queratinócitos humanos (HaCaT) utilizando a quantificação do corante cristal violeta. As células HaCaT foram expostas ao controle, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml por 1 hora, 4 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas. Os dados são apresentados como média ± SEM de, pelo menos, quatro experimentos realizados com quatro réplicas. A análise foi realizada por variância (ANOVA) bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). Significância definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

4.8 REAÇÃO DE *IMUNOBLOTTING* PARA ANÁLISE DE EXTRATO DE MEMBRANA CELULAR

Conforme as metodologias apresentadas nos itens 3.7, 3.9, 3.10, 3.11 e 3.18 da seção "Material e Métodos", foi preparado um extrato de membrana celular da linhagem RAEC. Por ter sido um ensaio bem-sucedido, as células foram submetidas às condições estudadas neste trabalho. A FIGURA 16 evidencia a detecção da fosfolipase-D no material preparado. A coluna C indica células controle, ou seja, apenas com privação de nutrientes, enquanto as colunas 1 e 2 representam RAEC incubadas por 1 hora e 4 horas, respectivamente, com LiRecDT1 50 µg/ml. É possível verificar que na coluna 1 a intensidade da banda é menor que na coluna 2, indicando que houve um acúmulo de toxina nestas células ao longo do tempo.

Figura 16. Análise representativa de *Western blotting* de extrato de membrana celular de endotélio de aorta de coelho (RAEC).



Legenda: Linhagem de endotélio de aorta de coelho (RAEC), após ensaio de extrato de membrana celular incubado com LiRecDT1 50 µg/ml por 1 hora (1) e por 4 horas (2). As amostras foram analisadas por *Western blotting* para identificação da proteína fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles intermedia*, com massa molecular aproximada de 32 kDa. A detecção foi realizada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase, utilizando o método de quimioluminescência.

Fonte: A autora (2024).

4.9 REAÇÕES DE *IMUNOBLOTTING* PARA DETECÇÃO DE MEMBRANA RESISTENTE À DETERGENTE (BALSAS LIPÍDICAS)

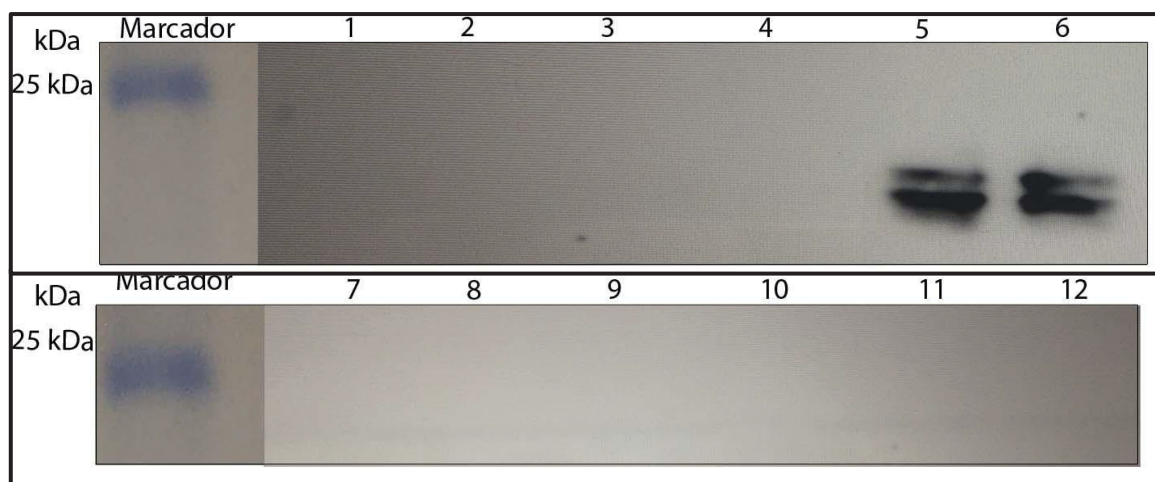
Conforme as metodologias apresentadas nos itens 3.7, 3.17, 3.11 e 3.18, respectivamente, da seção "Material e Métodos," foi realizada uma separação de membranas resistentes a detergentes, chamadas de balsas lipídicas, para obtenção

de frações da linhagem de queratinócitos humanos HaCaT. O objetivo desta separação foi identificar frações enriquecidas em balsas lipídicas (Zheng; Bollinger Bollag, 2003) que pudessem ser estudadas nas condições analisadas neste trabalho.

A fim de obter uma padronização, foram realizados vários ensaios com tamanhos de garrafas de cultivo e densidade celular diferentes, chegando-se à conclusão de que, em se tratando de queratinócitos humanos HaCaT são necessárias duas garrafas grandes de cultivo (75 cm²). Com o protocolo utilizado, 12 frações foram obtidas por cada processo de separação para se obter frações enriquecidas com quantidade proteica que facilite a visualização das bandas enriquecidas. Para concentração das amostras, o protocolo foi otimizado realizando um processo prévio de precipitação com TCA.

Após as amostras serem submetidas a corrida eletroforética, foram transferidas para membrana de nitrocelulose e por último foram submetidas a reação de imunomarcação. Para avaliação do conteúdo proteico foi utilizado o anticorpo anti-caveolina-1, isoformas α e β , com massa molecular de 21 kDa, afinal frações enriquecidas com balsas lipídicas apresentam uma grande quantidade dessa proteína amplamente utilizada como marcadores clássicos para a identificação destes micro domínios. A reação imunogênica foi revelada com o auxílio do anticorpo secundário conjugado à peroxidase, na qual a proteína alvo foi identificada nas frações 5 e 6, evidenciada pela FIGURA 17. A identificação desse conteúdo proteico, demonstra que o processo de separação dessas frações foi realizado de forma eficaz e corroborando a literatura (Lingwood et al., 2009; Simons; Ikonen, 1997).

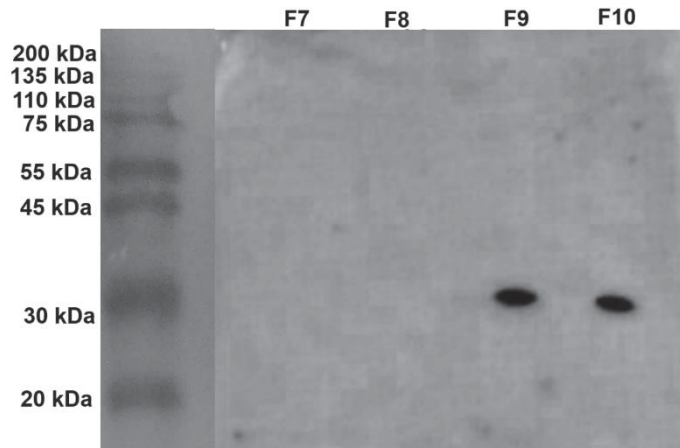
Figura 17. Análise representativa de *Western blotting* de isolamento de membrana resistente à detergente (balsas lipídicas) por ultracentrifugação em gradiente de sacarose.



Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) após fracionamento celular por ultracentrifugação em gradiente de sacarose (45%-35%-5%). Foram obtidas 12 frações de 800 μ l, cada uma, precipitadas com ácido tricloroacético a 10% e analisadas por *Western blotting*. A caveolina-1, com massa molecular aproximada de 21 kDa, está representada, indicando a padronização da técnica e a presença de balsas lipídicas nas frações 5 e 6. A detecção proteica foi realizada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase, utilizando o método de quimioluminescência. Fonte: A autora (2019).

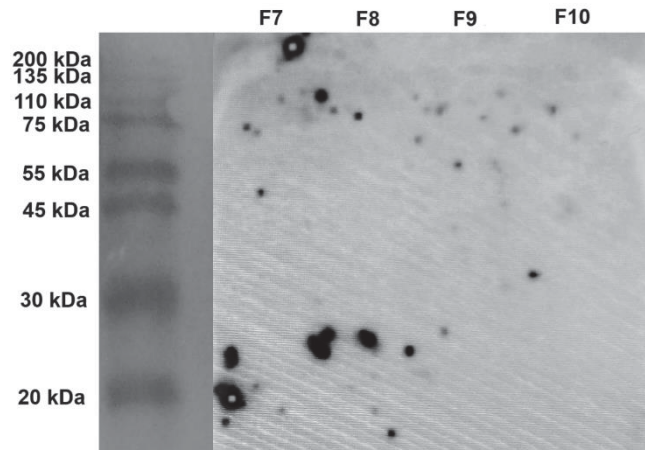
Após a padronização do ensaio, novas amostras foram submetidas às condições avaliadas buscando a identificação das proteínas Flotilina-1, com massa molecular de 43 kDa, Caveolina-1, com massa molecular de 22 kDa, e GAPDH, com massa molecular de 36 kDa. A reação imunogênica foi detectada com o auxílio do anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase por 1 hora. A proteína constitutiva, GAPDH, foi identificada nas frações 9 e 10, conforme FIGURA 18, frações F9 e F10. Por outro lado, as proteínas que são marcadores de balsas lipídicas α -flotilina e caveolina-1, não foram identificadas, conforme evidenciado pelas FIGURAS 19 e 20 respectivamente.

Figura 18. Análise representativa de *Western blotting* de extrato de membrana celular de queratinócitos humanos (HaCaT).



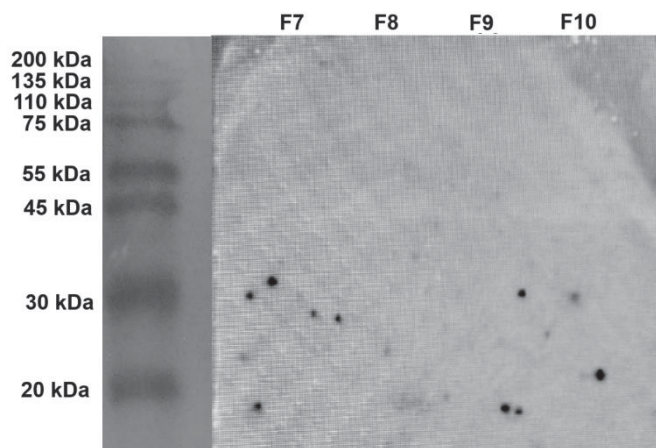
Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) após ensaio de extrato de membrana celular e precipitação proteica, com foco nas frações 7 (F7), 8 (F8), 9 (F9) e 10 (F10). As frações foram analisadas por *Western blotting* para identificação da proteína GAPDH, com massa molecular aproximada de 36 kDa, detectada nas frações 9 (F9) e 10 (F10). A detecção proteica foi realizada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase, utilizando o método de quimioluminescência.
Fonte: A autora (2024).

Figura 19. Análise representativa de *Western blotting* de extrato de membrana celular de queratinócitos humanos (HaCaT).



Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) após ensaio de extrato de membrana celular e precipitação proteica, com foco nas frações 7 (F7), 8 (F8), 9 (F9) e 10 (F10). As frações foram analisadas por *Western blotting* para identificação da proteína α -flotilina (flotilina-1), com massa molecular aproximada de 43 kDa. A detecção proteica foi realizada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase, utilizando o método de quimioluminescência.
Fonte: A autora (2024).

Figura 20. Análise representativa de *Western blotting* de extrato de membrana celular de queratinócitos humanos (HaCaT).



Legenda: Linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) após ensaio de extrato de membrana celular e precipitação proteica, com foco nas frações 7 (F7), 8 (F8), 9 (F9) e 10 (F10). As frações foram analisadas por *Western blotting* para identificação da proteína caveolina-1, com massa molecular aproximada de 22 kDa. A detecção proteica foi realizada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase, utilizando o método de quimioluminescência.

Fonte: A autora (2024).

Até a conclusão deste trabalho, foi possível padronizar a metodologia de extração de balsas lipídicas; no entanto, não foi possível identificar a toxina nem observar a reorganização das balsas lipídicas em função da atuação da fosfolipase-D de *Loxosceles intermedia* em queratinócitos e fibroblastos humanos.

4.10 ANÁLISE CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS POR IMAGEM ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Conforme descrito no item 3.7 e 3.19 da seção "Material e Métodos" foi realizada a avaliação da toxina ativa expressada com LiRecDT1-GFP sobre fibroblastos utilizando como metodologia a microscopia de fluorescência confocal. O ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a ligação da toxina à membrana celular e internalização das células.

Previamente aos dados apresentados abaixo, foram realizados diversos ensaios piloto, no qual foram utilizados anticorpos anti-PLD, produzidos por coelhos e por camundongos utilizando as toxinas expressadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Contudo as marcações, para este ensaio, mostraram inespecificidade. Por isso, foi padronizado o ensaio com a utilização da toxina LiRecDT1-GFP, com detecção da GFP para este ensaio.

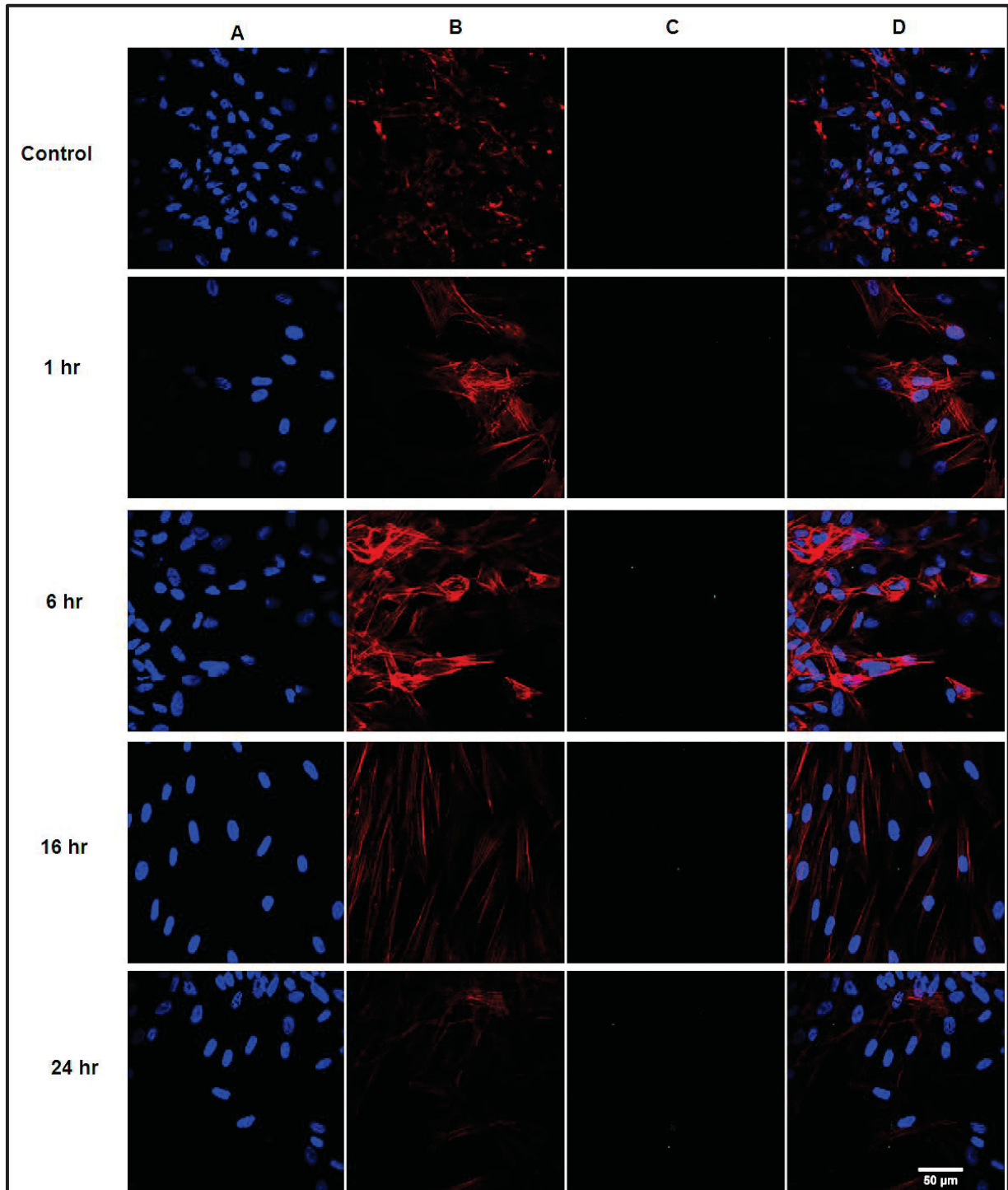
A FIGURA 21 refere-se a linhagem HFF-1, no qual os itens *control* C e D não apresentam fluorescência em verde e por isso demonstram que não houve interação

dos anticorpos secundários com estruturas inespecíficas. Foi verificado ainda que nenhum dos anticorpos secundários apresenta interação com estruturas celulares que não as desejadas, pois a marcação da LiRecDT1-GFP foi realizada com anticorpos poli clonais que reconhecem a GFP, visualizada pela cor verde. As imagens representam uma fatia do corte com foco do eixo Z e no último quadrante uma imagem mesclada. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

A interação da toxina LiRecDT1-GFP 25 µg/ml com a membrana plasmática dos fibroblastos está evidenciada nas imagens a seguir. A FIGURA 21 equivale a uma prancha com um recorte do campo capturado com incubações de 1 hora, 6 horas, 16 horas e 24 horas. Na FIGURA 22, é possível visualizar o campo completo capturado com aumento de 60x, incluindo insertos com aumento de 20x para uma melhor visualização da toxina no quadrante C e uma imagem mesclada no quadrante D. Esta figura destaca os tempos de 1 hora e 6 horas de incubação, que mostram um aumento na quantidade de toxina ligada à membrana celular de forma tempo dependente.

A FIGURA 23 mostra uma diminuição das toxinas ligadas à membrana, conforme evidenciado nos tempos de 16 horas e 24 horas. Sabe-se que as toxinas estão apenas na superfície da membrana, pois este ensaio não foi submetido ao uso de saponina e as imagens foram capturadas com cortes em Z pelo sistema confocal. As saponinas são glicosídeos com ação detergente e surfactante que, quando aplicadas ao cultivo celular, induzem a permeabilização da membrana celular.

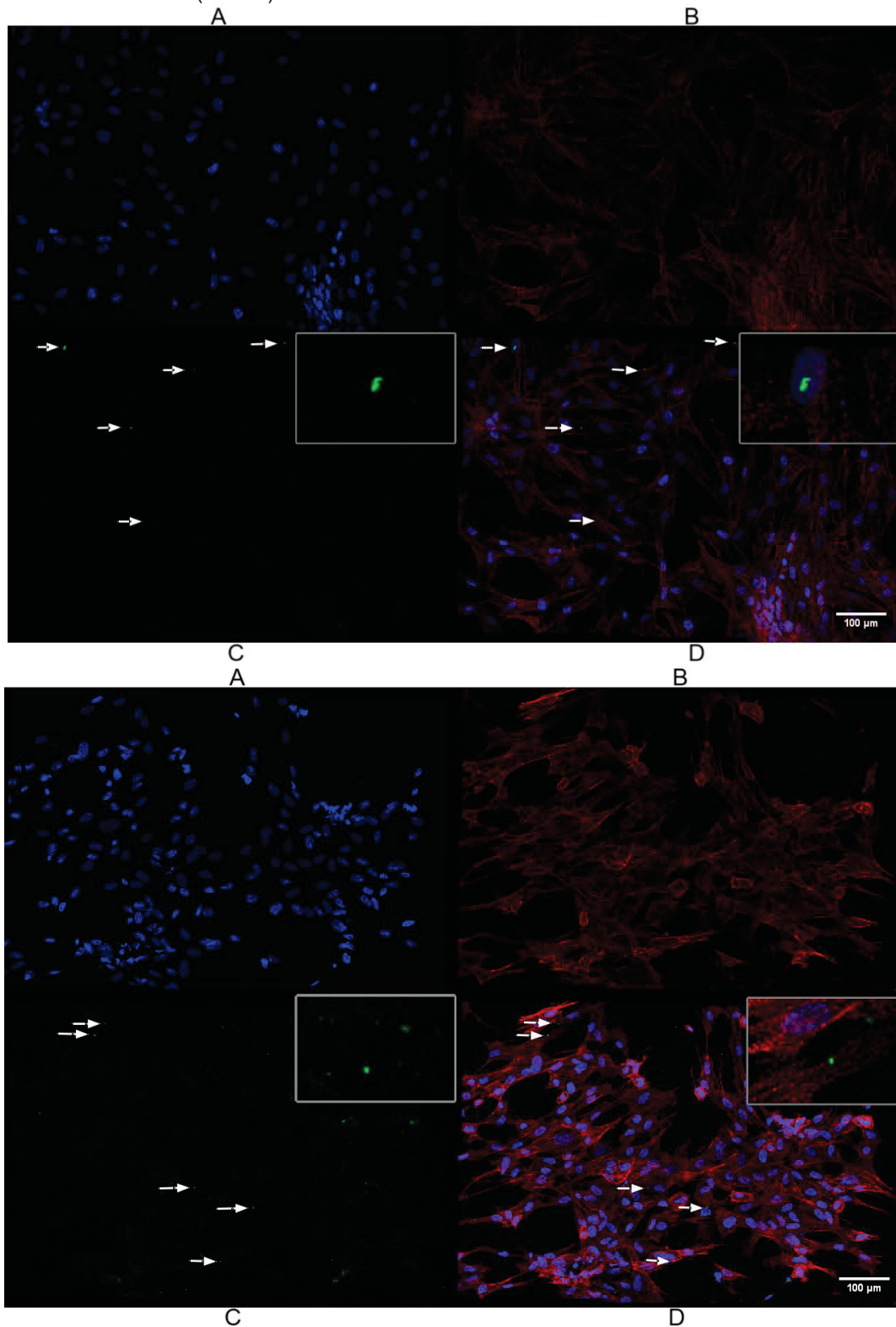
Figura 21. Ligação da toxina recombinante LiRecDT1-GFP à membrana celular de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1).



Legenda: Análise de fluorescência por microscopia confocal de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostas ao controle e à toxina LiRecDT1-GFP 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ após 1 hora, 6 horas, 16 horas e 24 horas de incubação. A imunodeteção foi realizada em células não permeabilizadas para visualizar a ligação da toxina à membrana celular. DAPI em azul para marcação de estruturas nucleares (A), Faloidina em vermelho para marcação de F-actina (B), toxina LiRecDT1-GFP em verde (C) e imagens mescladas (D). Imagem do campo com aumento de 60X. As imagens foram capturadas com o microscópio Leica SR GSD 3D e mescladas pelo *software* ImageJ 1.53.

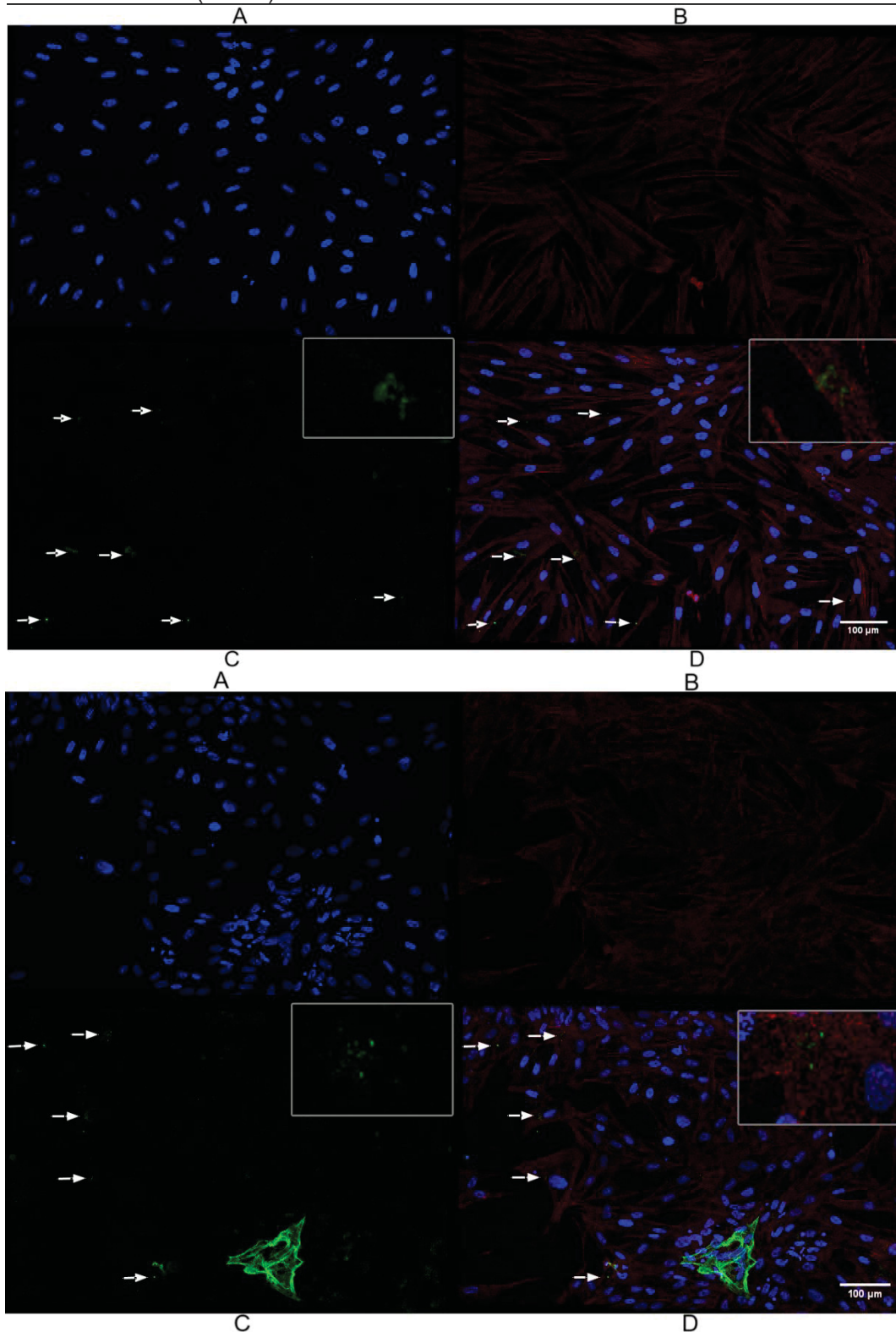
Fonte: A autora (2019).

Figura 22. Ligação da toxina recombinante LiRecDT1-GFP à membrana celular de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1).



Legenda: Análise de fluorescência por microscopia confocal de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostas à toxina LiRecDT1-GFP 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ após 1 hora e 6 horas de incubação. A imunodeteção foi realizada em células não permeabilizadas para visualizar a ligação da toxina à membrana celular. Imagem do campo com aumento de 60X. Inserto com aumento de 20X. DAPI em azul para marcação de estruturas nucleares (A), Faloidina em vermelho para marcação de F-actina (B), toxina LiRecDT1-GFP em verde (C) e imagens mescladas (D). As imagens foram capturadas com o microscópio Leica SR GSD 3D e mescladas pelo *software* ImageJ 1.54f. Fonte: A autora (2024).

Figura 23. Ligação da toxina recombinante LiRecDT1-GFP à membrana celular de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1).



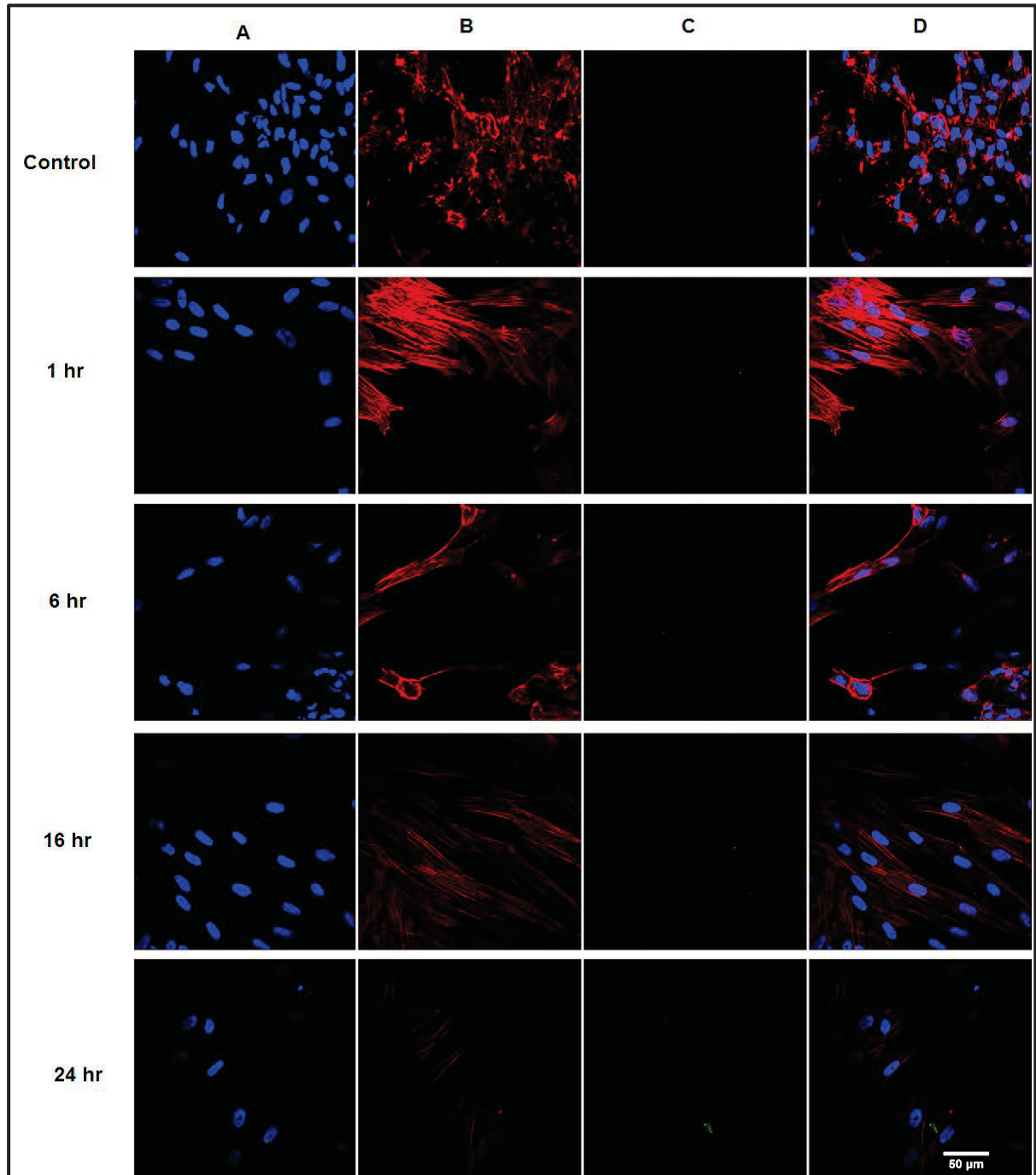
Legenda: Análise de fluorescência por microscopia confocal de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostas à toxina LiRecDT1-GFP 25 µg/ml após 16 hora e 24 horas de incubação. A imunodeteção foi realizada em células não permeabilizadas para visualizar a ligação da toxina à membrana celular. Imagem do campo com aumento de 60X. Inserto com aumento de 20X. DAPI em azul para marcação de estruturas nucleares (A), Faloidina em vermelho para marcação de F-actina (B), toxina LiRecDT1-GFP em verde (C) e imagens mescladas (D). As imagens foram capturadas com o microscópio Leica SR GSD 3D e mescladas pelo *software* ImageJ 1.54f. Fonte: A autora (2024).

A FIGURA 24 apresenta uma prancha com um recorte do campo capturado durante as incubações de 1 hora, 6 horas, 16 horas e 24 horas. Nesta figura, é possível observar a internalização da toxina LiRecDT1-GFP pela linhagem de fibroblastos humanos HFF-1 já a partir de 1 hora de incubação.

A FIGURA 25 apresenta o campo completo capturado com aumento de 60X, incluindo insertos com aumento de 20X para uma melhor visualização da internalização da toxina no quadrante C e uma imagem mesclada no quadrante D. Esta figura destaca o aumento na quantidade de proteínas ou agregados proteicos de forma dependente do tempo, corroborando os resultados mostrados nas figuras anteriores.

A FIGURA 26 mostra que, após 16 horas de incubação, há um aumento na quantidade de toxinas internalizadas. Após 24 horas, essas toxinas estão organizadas intracelularmente de maneira ordenada, sugerindo que a internalização pode ter ocorrido por meio de alguma organela. A internalização das toxinas é confirmada pelo fato de as amostras terem sido tratadas com saponina.

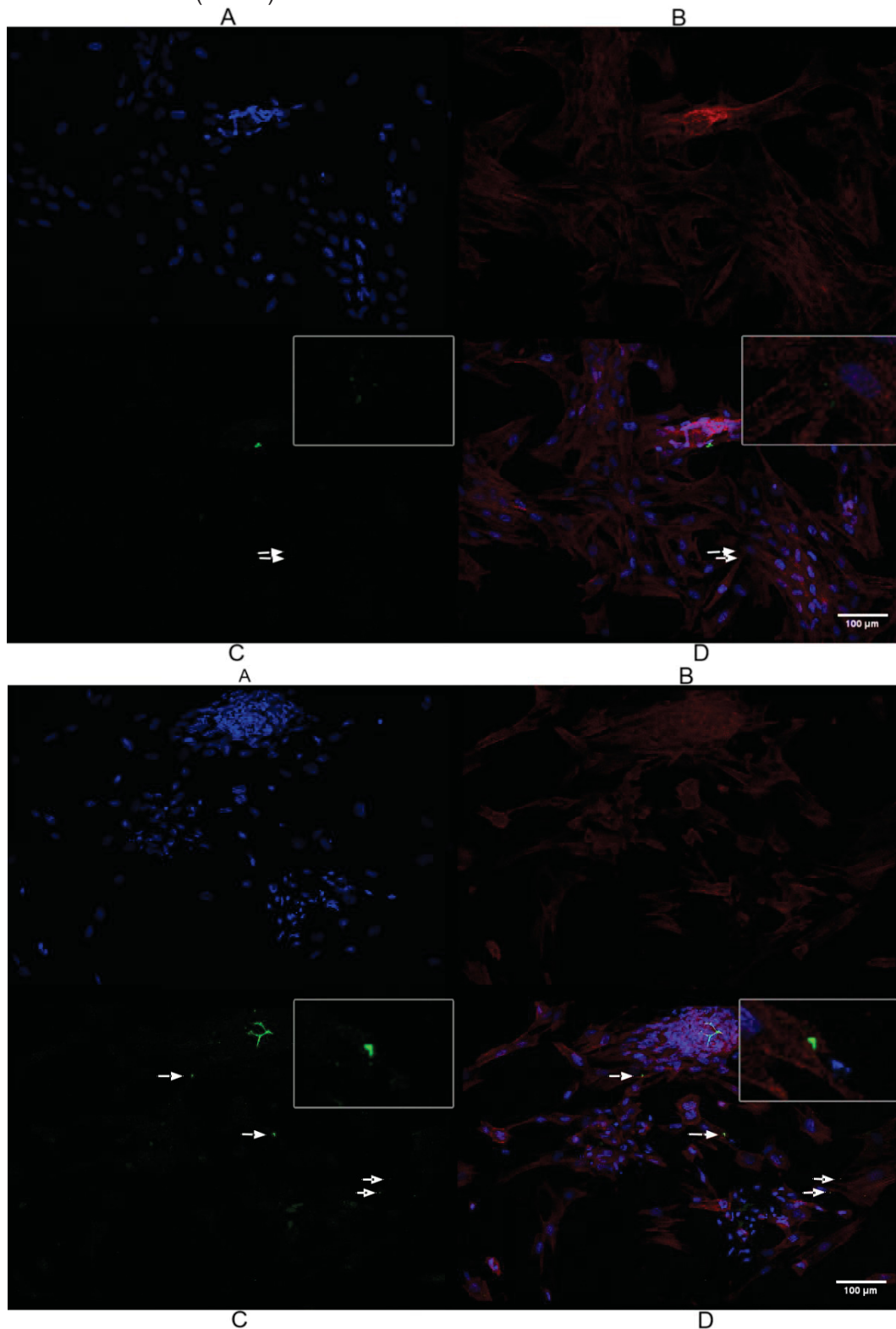
Figura 24. Internalização da toxina recombinante LiRecDT1-GFP em células de fibroblastos humanos (HFF-1).



Legenda: Análise de fluorescência por microscopia confocal de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostas ao controle e à toxina LiRecDT1-GFP 25 μg/ml após 1 hora, 6 horas, 16 horas e 24 horas de incubação. A imunodeteção foi realizada em células permeabilizadas para visualizar a internalização da toxina. DAPI em azul para marcação de estruturas nucleares (A), Faloidina em vermelho para marcação de F-actina (B), toxina LiRecDT1-GFP em verde (C) e imagens mescladas (D). As imagens foram capturadas com o microscópio Leica SR GSD 3D e mescladas pelo *software* ImageJ 1.53.

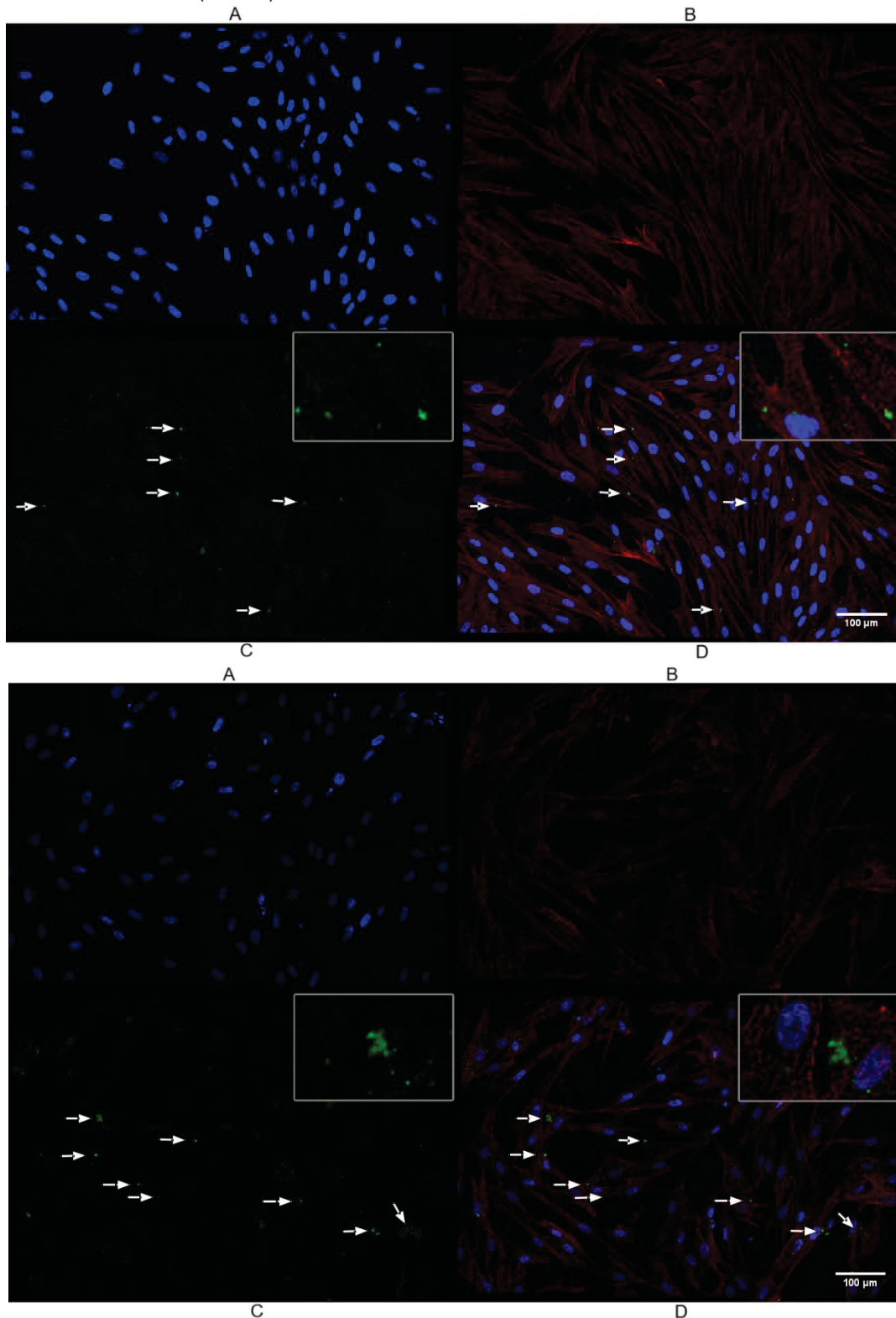
Fonte: A autora (2019).

Figura 25. Ligação da toxina recombinante LiRecDT1-GFP à membrana celular de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1).



Legenda: Análise de fluorescência por microscopia confocal de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostas à toxina LiRecDT1-GFP 25 µg/ml após 1 hora e 6 horas de incubação. A imunodeteção foi realizada em células permeabilizadas para visualizar a internalização da toxina. DAPI em azul para marcação de estruturas nucleares (A), Faloidina em vermelho para marcação de F-actina (B), toxina LiRecDT1-GFP em verde (C) e imagens mescladas (D). Imagem do campo com aumento de 60X. Inserto com aumento de 20X. As imagens foram capturadas com o microscópio Leica SR GSD 3D e mescladas pelo *software* ImageJ 1.54f. Fonte: A autora (2024).

Figura 26. Ligação da toxina recombinante LiRecDT1-GFP à membrana celular de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1).



Legenda: Análise de fluorescência por microscopia confocal de células da linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostas à toxina LiRecDT1-GFP 25 µg/ml após 16 hora e 24 horas de incubação. A imunodeteccção foi realizada em células permeabilizadas para visualizar a internalização da toxina. DAPI em azul para marcação de estruturas nucleares (A), Faloidina em vermelho para marcação de F-actina (B), toxina LiRecDT1-GFP em verde (C) e imagens mescladas (D). Imagem do campo com aumento de 60X. Inserto com aumento de 20X. As imagens foram capturadas com o microscópio Leica SR GSD 3D e mescladas pelo *software* ImageJ 1.54f. Fonte: A autora (2024).

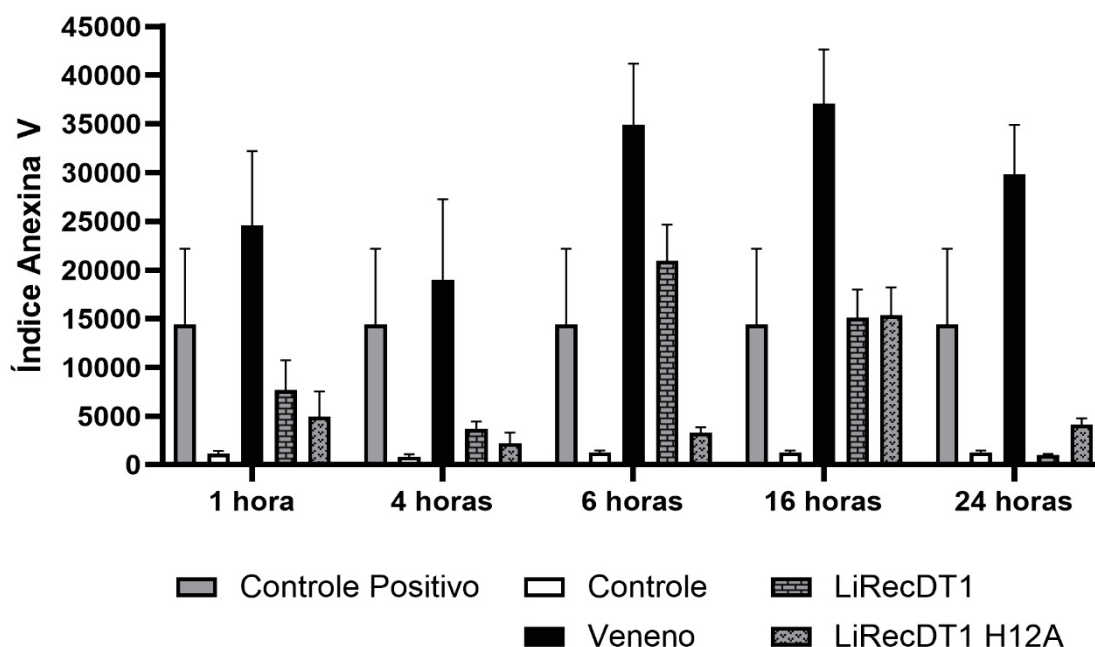
4.11 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE MORTE CELULAR

A avaliação de morte celular foi realizada por citometria de fluxo, a partir da marcação das células com Anexina-V e 7-AAD, conforme itens 3.7 e 3.20 da seção "Material e Métodos". Os controles positivos foram utilizados e apontados nos gráficos como indicação de eficiência dos ensaios.

Os resultados de queratinócitos humanos HaCaT que analisam a apoptose inicial, estão apresentados no GRÁFICO 8, a partir da captura de 100.000 eventos. Os dados são apresentados em eventos, conforme a população marcada com Anexina-V que não é capaz de se ligar a células vitais normais, uma vez que a molécula não é capaz de penetrar na bicamada de fosfolipídios.

Este resultado mostra que, ainda que não haja diferença estatística entre as condições de incubação em HaCaT, foi possível identificar a exposição da fosfatidilserina e consequentemente alteração em membrana celular dos queratinócitos.

Gráfico 8. Análise de morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, utilizando a proteína Anexina-V conjugada com FITC, nos tempos de 1 hora, 4 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas.



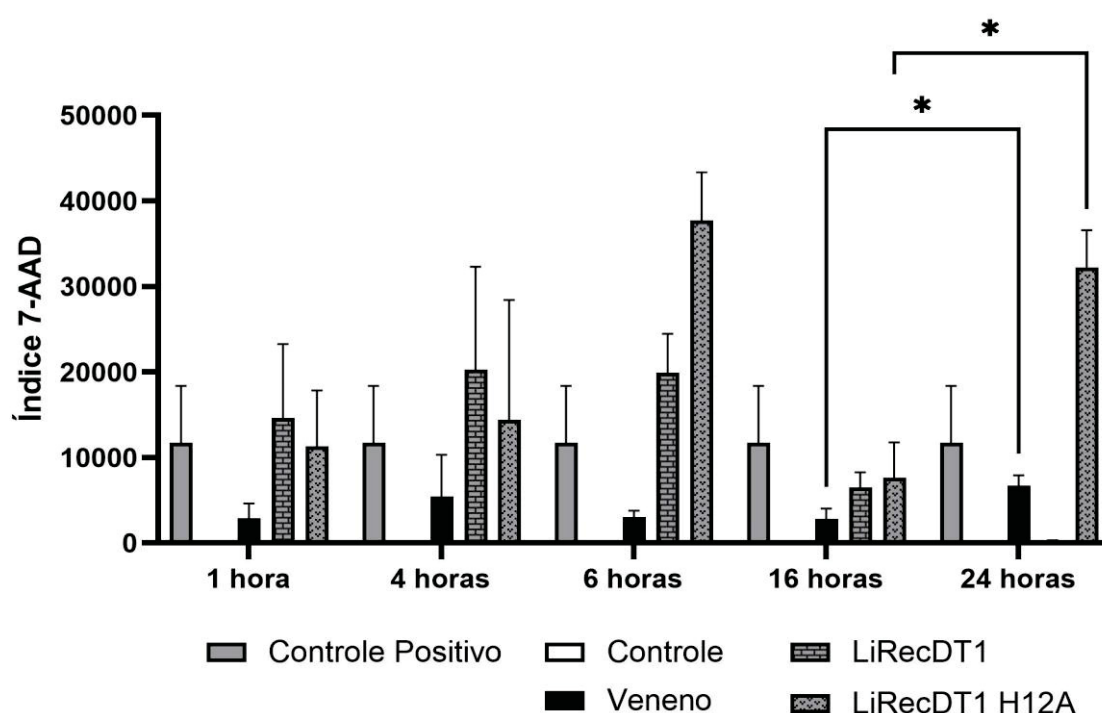
Legenda: Análise de citometria de fluxo da linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) exposta ao controle positivo (Anexina-V), controle negativo, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. O índice de fluorescência relativa dos eventos foi medido utilizando a proteína Anexina-V conjugada com FITC. Os dados são apresentados como média ± SEM de três experimentos independentes. A análise dos dados foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o *software* GraphPad Prism

(versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). A significância foi definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

Na sequência, o GRÁFICO 9 evidencia o resultado da marcação da linhagem de queratinócitos humano (HaCaT) com a população marcada com 7-AAD, um corante que se liga ao DNA, indicativo de apoptose tardia. Este resultado mostra que, dentre os eventos indicando células em processo de apoptose, existe diferença estatisticamente significativa entre as células que foram expostas ao veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml por 16 horas e aquelas que foram expostas por 24 horas. Bem como as células que foram induzidas por LiRecDT1 H12A 25 µg/ml após 16 horas de incubação e 24 horas de incubação. Em ambos os casos, a condição de incubação das células causa um aumento nos no número de células marcadas com 7-AAD, indicando um comprometimento de membrana.

Gráfico 9. Análise de morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, utilizando o fluorocromo 7-AAD, nos tempos de 1 hora, 4 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas.



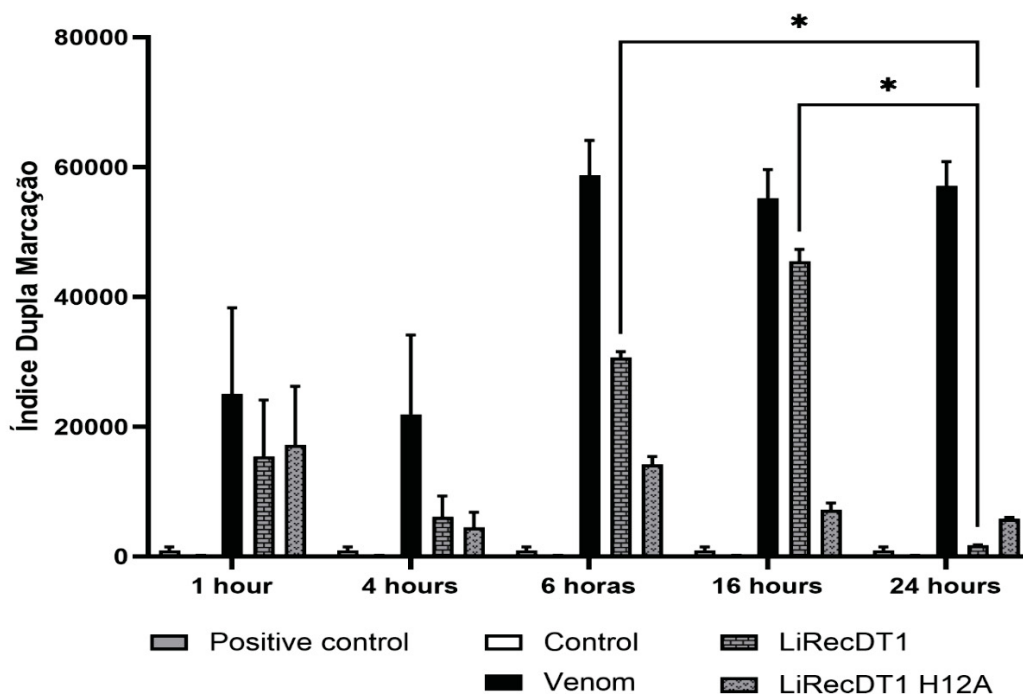
Legenda: Análise de citometria de fluxo da linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) exposta ao controle positivo (7-AAD), controle negativo, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. O índice de fluorescência relativa dos eventos foi mensurado utilizando o fluorocromo 7-AAD. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes. A análise dos dados foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). A significância foi definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

No GRÁFICO 10, os resultados apresentados mostram a linhagem HaCaT sob as mesmas condições de exposição ao veneno total e fosfolipases, com eventos de dupla marcação. A dupla marcação indica células em fase de apoptose tardia ou necrose. O gráfico evidencia uma diferença estatística nas células induzidas por LiRecDT1 25 µg/ml entre 6 horas e 24 horas, bem como entre 16 horas e 24 horas, mostrando uma redução drástica nas células duplamente marcadas. Essa diminuição, associada aos resultados observados pela microscopia de contraste de fase, permite concluir que as células iniciaram o processo de morte a partir das 6 horas, aumentaram em 16 horas, e, após 24 horas, a densidade celular foi insuficiente para permitir a marcação com Anexina-V e 7-AAD.

Além dos resultados mencionados, o Anexo I, TABELA 7, evidencia todas as significâncias estatísticas da análise. No entanto, essas diferenças não foram o principal foco da nossa análise e, portanto, não são detalhadas aqui. O foco principal foi dirigido para os efeitos do fator tempo, comparando as condições entre si.

Gráfico 10. Análise de morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes), utilizando marcação por Anexina-V e 7-AAD, nos tempos de 1 hora, 4 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas.



Legenda: Análise de citometria de fluxo da linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) exposta ao controle positivo (Anexina-V e 7-AAD), controle negativo, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. O índice de fluorescência relativa dos eventos foi mensurado utilizando a proteína Anexina-V conjugada com FITC e o fluorocromo 7-AAD. Os dados são apresentados como média ± SEM de três experimentos independentes. A análise foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey. A análise estatística foi efetuada

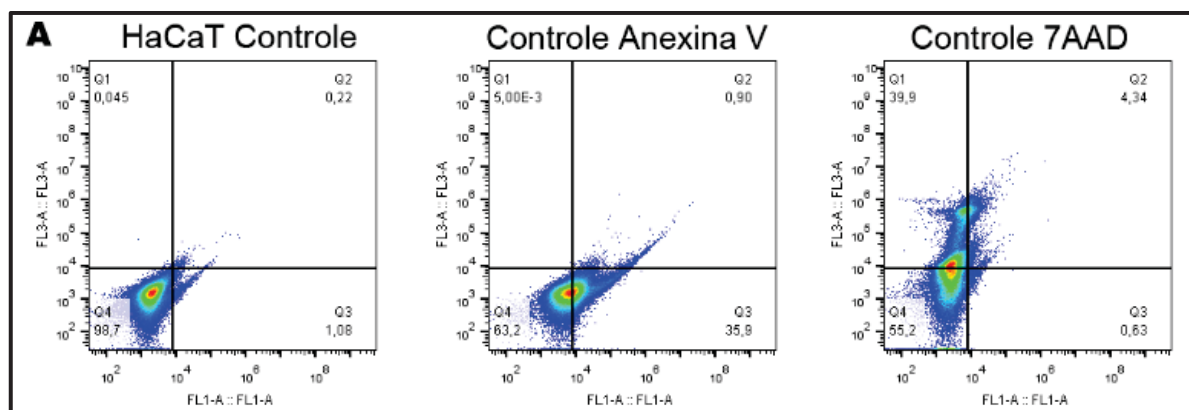
utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). A significância foi definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

Para uma melhor compreensão dos resultados, apresentamos a seguir dados complementares, incluindo imagens representativas de um dos experimentos. A FIGURA 27 mostra os *dot plots* típicos das células HaCaT mantidas em meio DMEM após 2 horas de restrição de Soro Fetal Bovino, como controle. A amostra sem marcador é identificada como "controle", enquanto os controles positivos são identificados como "controle Anexina-V" e "controle 7-AAD".

A FIGURA 28A mostra os *dot plots* típicos das células expostas ao veneno total 25 $\mu\text{g/ml}$, LiRecDT1 25 $\mu\text{g/ml}$ e LiRecDT1 H12A 25 $\mu\text{g/ml}$ após 1 hora de exposição. A FIGURA 28B apresenta os resultados após 4 horas de exposição nas mesmas condições. A FIGURA 28C exhibe os resultados após 6 horas de exposição. A FIGURA 28D mostra os resultados após 16 horas de exposição e a FIGURA 28E, após 24 horas de exposição.

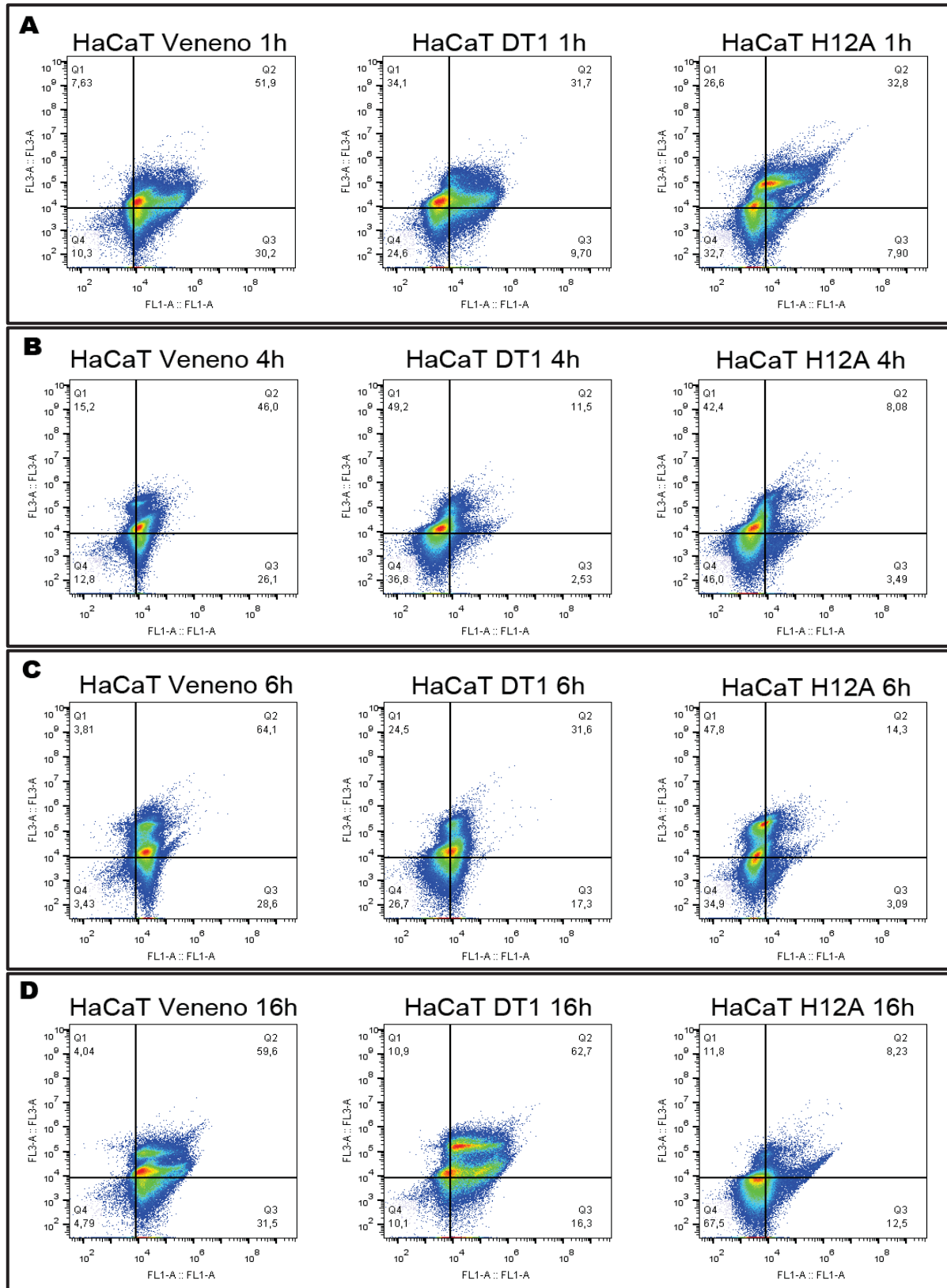
Figura 27. Controles do ensaio de morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT).

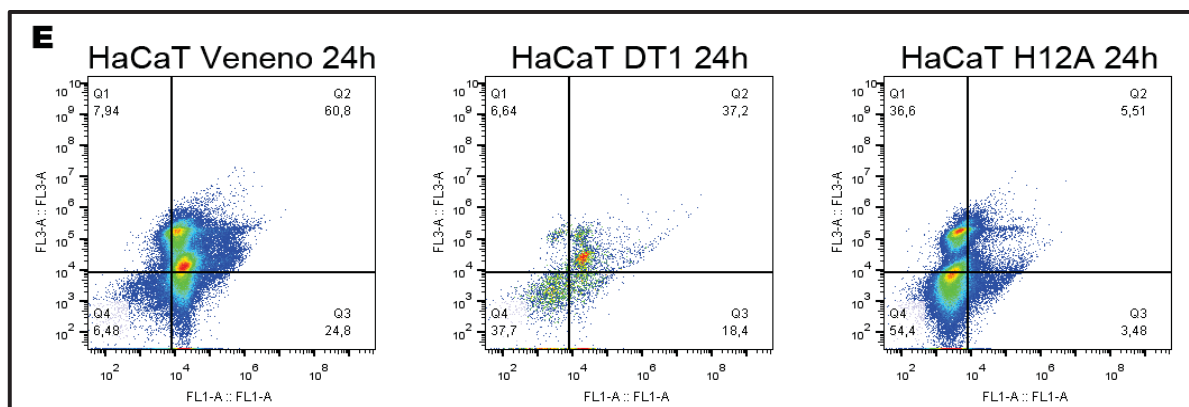


Legenda: Marcadores de morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT) expostos ao controle, controle Anexina-V e controle 7-AAD. O canal FL1, com filtro verde, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por Anexina-V FITC (530/30 nm). O canal FL3, com filtro vermelho, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por 7-AAD (670 LP). (Q1) 7-AAD positivo, Dupla marcação (Q2), Anexina-V positivo (Q3), sem marcação (Q4).

Fonte: A autora (2019).

Figura 28. Ensaio de morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT) incubados com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes.



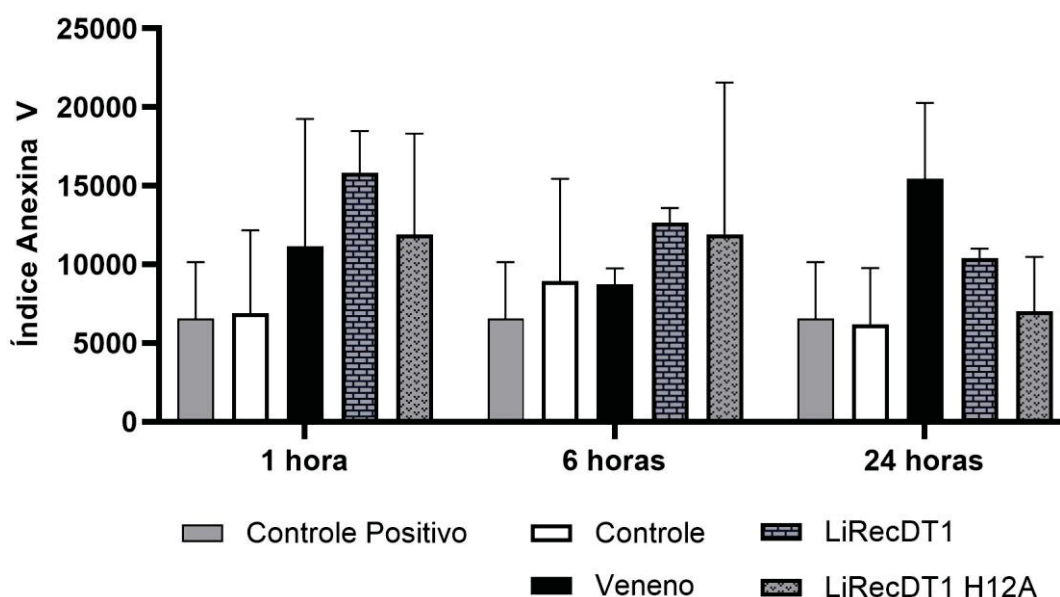


Legenda: Marcadores de morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT) expostos a veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml após 1 hora (A), 4 horas (B), 6 horas (C), 16 horas (D) e 24 horas (E) de incubação. O canal FL1, com filtro verde, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por Anexina-V FITC (530/30 nm). O canal FL3, com filtro vermelho, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por 7-AAD (670 LP). 7-AAD positivo (Q1), Dupla marcação (Q2), Anexina-V positivo (Q3), sem marcação (Q4).
Fonte: A autora (2019).

Os resultados de fibroblastos humanos HFF-1 que analisam a apoptose inicial, estão apresentados no GRÁFICO 11, a partir da captura de 100.000 eventos. Os dados são apresentados em eventos, conforme a população marcada com Anexina-V que não é capaz de se ligar a células vitais normais, uma vez que a molécula não é capaz de penetrar na bicamada de fosfolipídios.

Este resultado mostra que, ainda que não haja diferença estatística entre as condições de incubação em HFF-1, foi possível identificar a exposição da fosfatidilserina e consequentemente alteração em membrana celular dos fibroblastos.

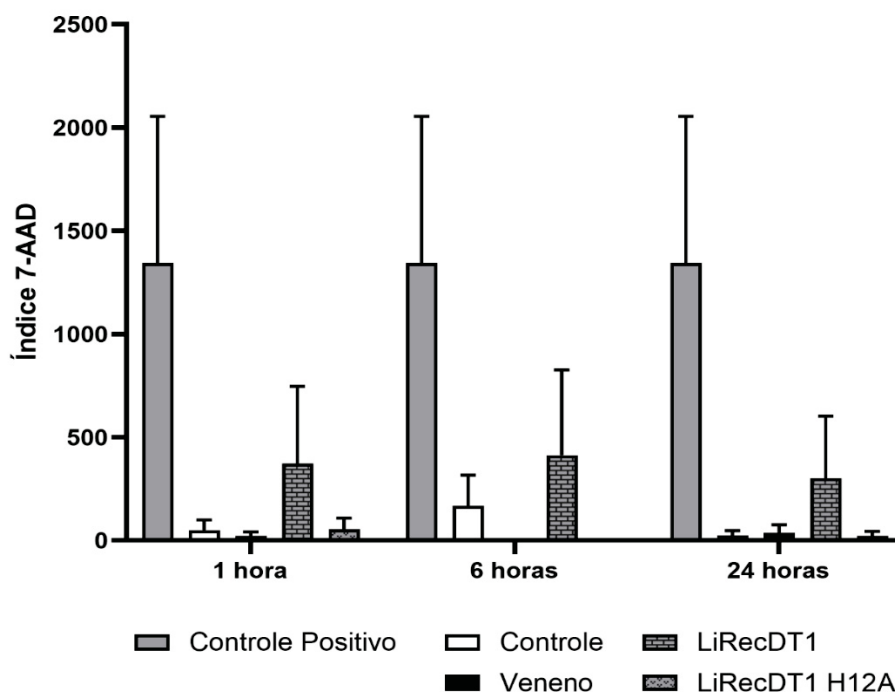
Gráfico 11. Análise de morte celular em fibroblastos humanos (HFF-1) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, utilizando Anexina-V conjugada com FITC, nos tempos de 1 hora, 6 horas e 24 horas.



Legenda: Análise de citometria de fluxo da linhagem celular de fibroblastos humanos (HFF-1) exposta ao controle positivo (Anexina-V), controle negativo, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. A fluorescência relativa dos eventos foi medida utilizando Anexina-V conjugada com FITC. Os dados são apresentados como média ± SEM de dois experimentos independentes. A análise foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada, seguida do teste post hoc de Tukey. A análise estatística foi efetuada utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). A significância foi definida como $p < 0,05$. Fonte: A autora (2024).

No GRÁFICO 12, é possível observar o índice de marcação da linhagem de fibroblastos humanos HFF-1 com 7-AAD, um corante que se liga ao DNA e indica apoptose tardia. Os resultados mostram que a quantidade de células neste estágio de morte celular é baixa, sugerindo que este não seja o tipo predominante de morte celular ocorrendo nas amostras analisadas.

Gráfico 12. Análise de morte celular em fibroblastos humanos (HFF-1) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, utilizando o fluorocromo 7-AAD, nos tempos de 1 hora, 6 horas e 24 horas.

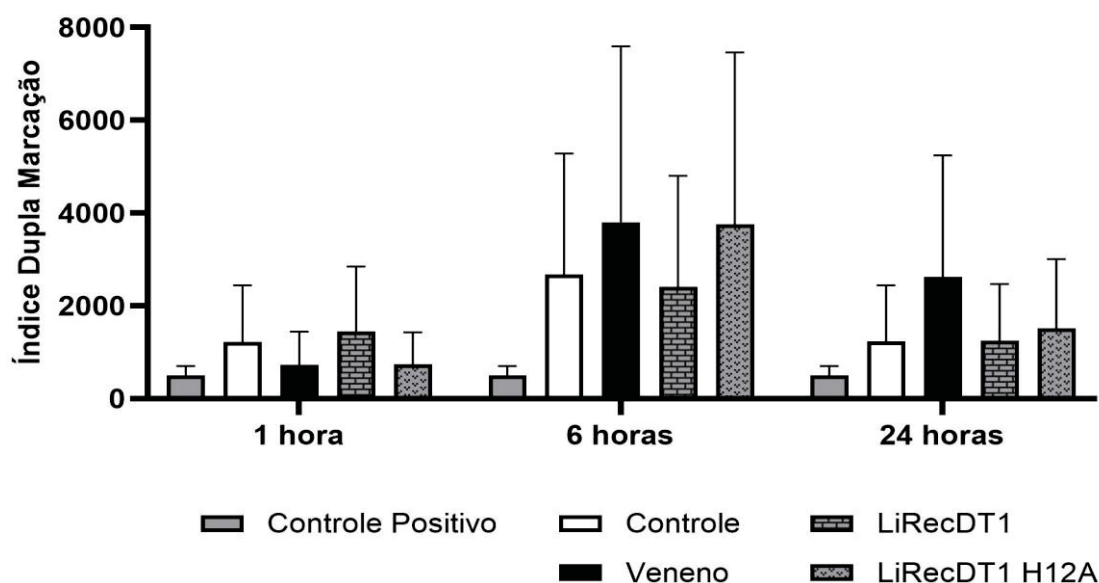


Legenda: Análise de citometria de fluxo da linhagem celular de fibroblastos humanos (HFF-1) exposta ao controle positivo (7-AAD), controle negativo, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. A fluorescência relativa dos eventos foi medida utilizando o fluorocromo 7-AAD. Os dados são apresentados como média ± SEM de dois experimentos independentes. A análise foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey. A análise estatística foi efetuada utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). A significância foi definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

No GRÁFICO 13, é possível observar o índice de marcação da linhagem de fibroblastos humanos HFF-1 com Anexina-V e 7-AAD. A dupla marcação indica células em fase de apoptose tardia ou necrose. Os resultados mostram que a quantidade de células neste estágio de morte celular é baixa, sugerindo que este não seja o tipo predominante de morte celular ocorrendo nas amostras analisadas.

Gráfico 13. Análise de morte celular em fibroblastos humanos (HFF-1) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, com marcação por Anexina-V e 7-AAD, nos tempos de 1 hora, 6 horas e 24 horas.



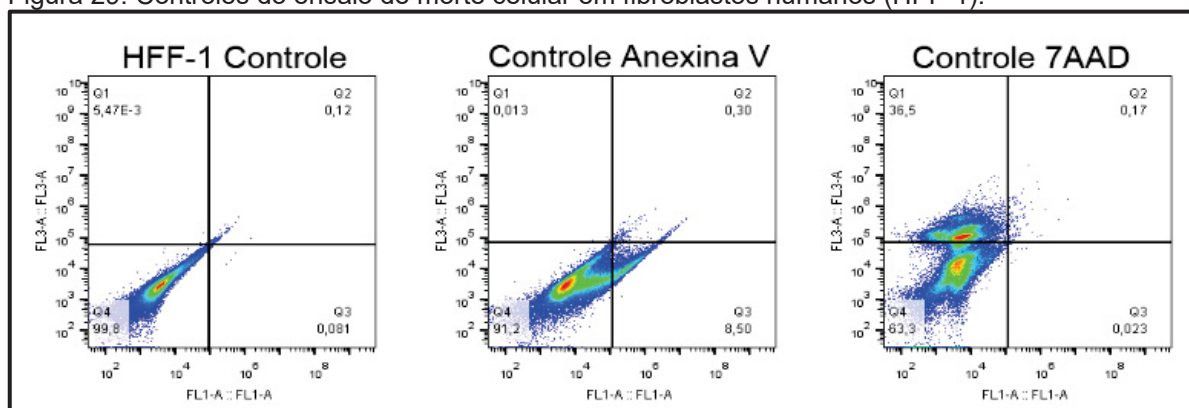
Legenda: Análise de citometria de fluxo da linhagem celular de fibroblastos humanos (HFF-1) exposta ao controle positivo (Anexina-V e 7-AAD), controle negativo, veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml. A fluorescência relativa dos eventos foi medida utilizando a proteína Anexina-V conjugada com FITC e o fluorocromo 7-AAD. Os dados são apresentados como média ± SEM de três experimentos independentes. A análise foi realizada por ANOVA bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tukey. A análise estatística foi efetuada utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA). A significância foi definida como $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2024).

Para uma melhor compreensão dos resultados, apresentamos a seguir dados complementares, incluindo imagens representativas de um dos experimentos. A FIGURA 29 mostra os *dot plots* típicos das células HFF-1 mantidas em meio DMEM após 2 horas de restrição de Soro Fetal Bovino, como controle. A amostra sem marcador é identificada como "controle", enquanto os controles positivos são identificados como "controle Anexina-V" e "controle 7-AAD".

A FIGURA 30A mostra os *dot plots* típicos das células expostas ao veneno total 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml após 1 hora de exposição. A FIGURA 30B apresenta os resultados após 4 horas de exposição nas mesmas condições. A FIGURA 30C exhibe os resultados após 6 horas de exposição. A FIGURA 30D mostra os resultados após 16 horas de exposição e a FIGURA 30E, após 24 horas de exposição.

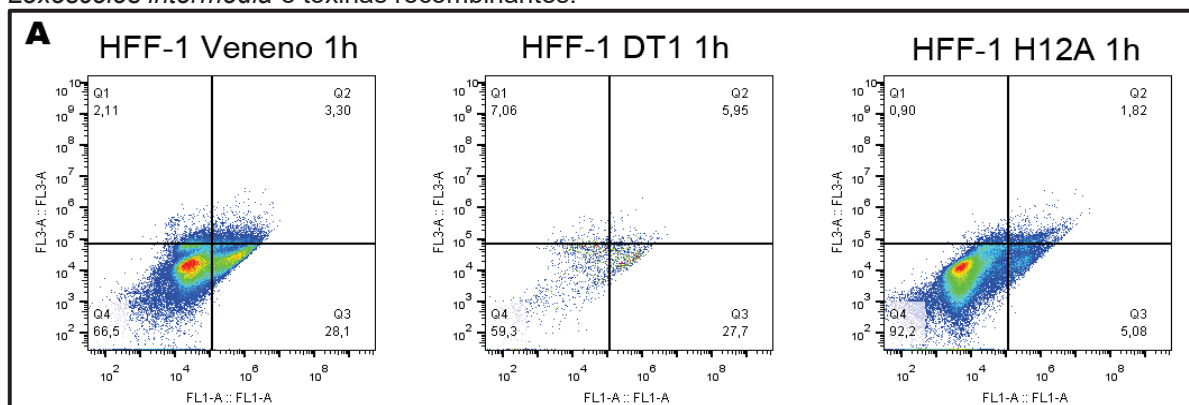
Figura 29. Controles do ensaio de morte celular em fibroblastos humanos (HFF-1).

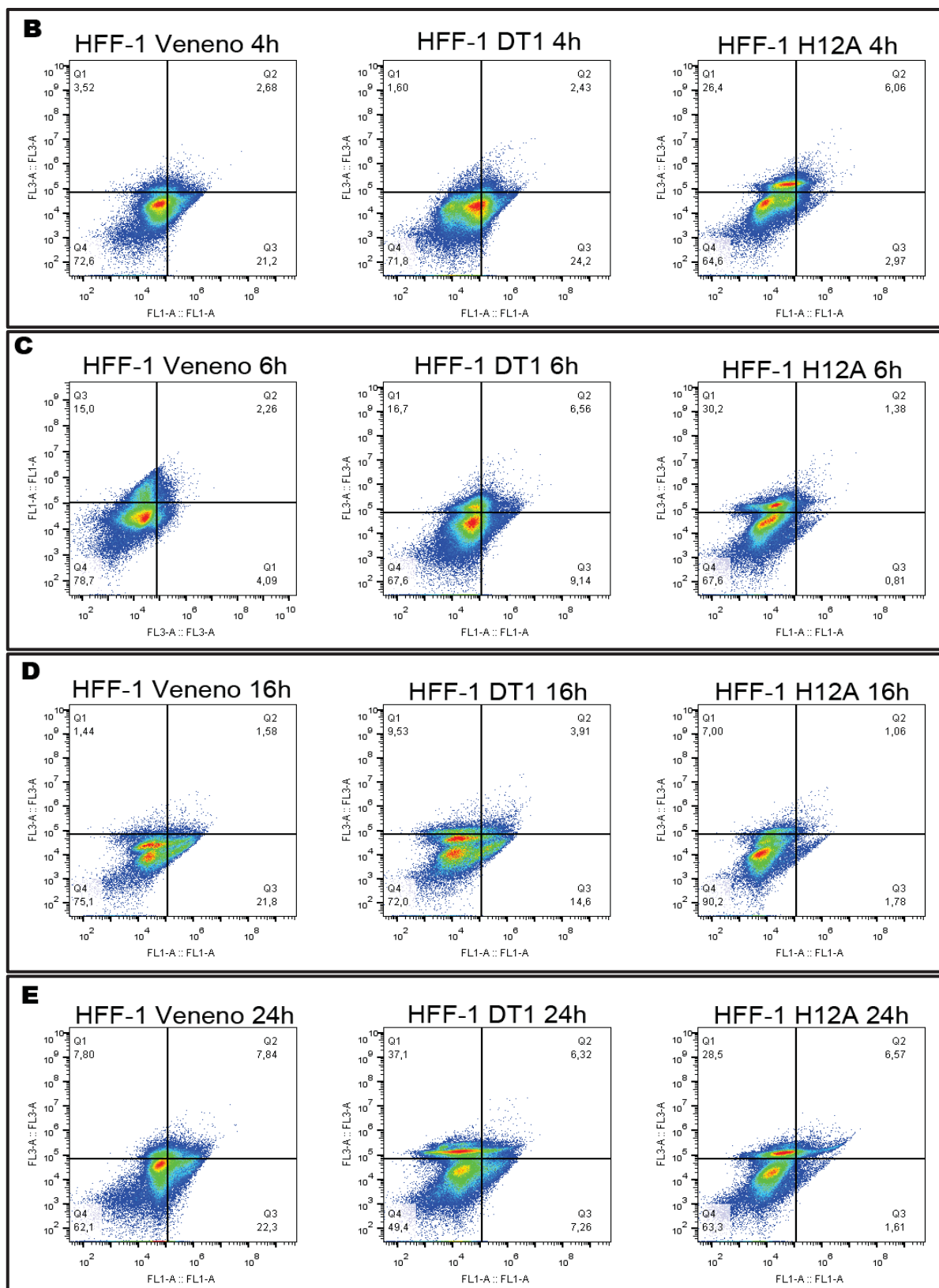


Legenda: Marcadores de morte celular na linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostos ao controle, controle Anexina-V, e controle 7-AAD. O canal FL1, com filtro verde, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por Anexina-V FITC (530/30 nm). O canal FL3, com filtro vermelho, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por 7-AAD (670 LP). 7-AAD (Q1), Duplo Marcado (Q2), Anexina-V (Q3), sem marcação (Q4).

Fonte: A autora (2019).

Figura 30. Ensaio de morte celular em fibroblastos humanos (HFF-1) incubados com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes.





Legenda: Marcadores de morte celular na linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) expostos ao veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml, LiRecDT1 25 µg/ml e LiRecDT1 H12A 25 µg/ml após 1 hora (A), 4 horas (B), 6 horas (C), 16 horas (D) e 24 horas (E) de incubação. O canal FL1, com filtro verde, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por Anexina-V FITC (530/30 nm). O canal FL3, com filtro vermelho, foi utilizado para detectar a fluorescência emitida por 7-AAD (670 LP). 7-AAD (Q1), Duplo Marcado (Q2), Anexina-V (Q3) e sem marcação (Q4).

Fonte: A autora (2019).

4.12 ANÁLISE DE MEMBRANA CELULAR DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS HUMANOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTO DESEMPENHO

O ensaio de HPTLC foi realizado com o objetivo de analisar a melhor separação e detecção de composição das membranas celulares e possível interferência da ação da toxina ativa sobre as linhagens HaCaT e HFF-1, conforme item 3.7 e 3.21 da seção "Material e Métodos".

Foi realizada a coloração da placa com o corante Primulina e visualizada por UV para identificação da classe lipídica dos fosfolipídios. Sendo assim, na coluna 1 da FIGURA 31 há uma mistura de padrões de perfil cromatográfico de fosfolipídios, no qual PE equivale a fosfoetanolamina, PC equivale a fosfatidilcolina, PS equivale a fosfatidilserina e PI equivale a fosfatidilinositol e SM equivale a esfingomielina, assim como na coluna 8, separadamente.

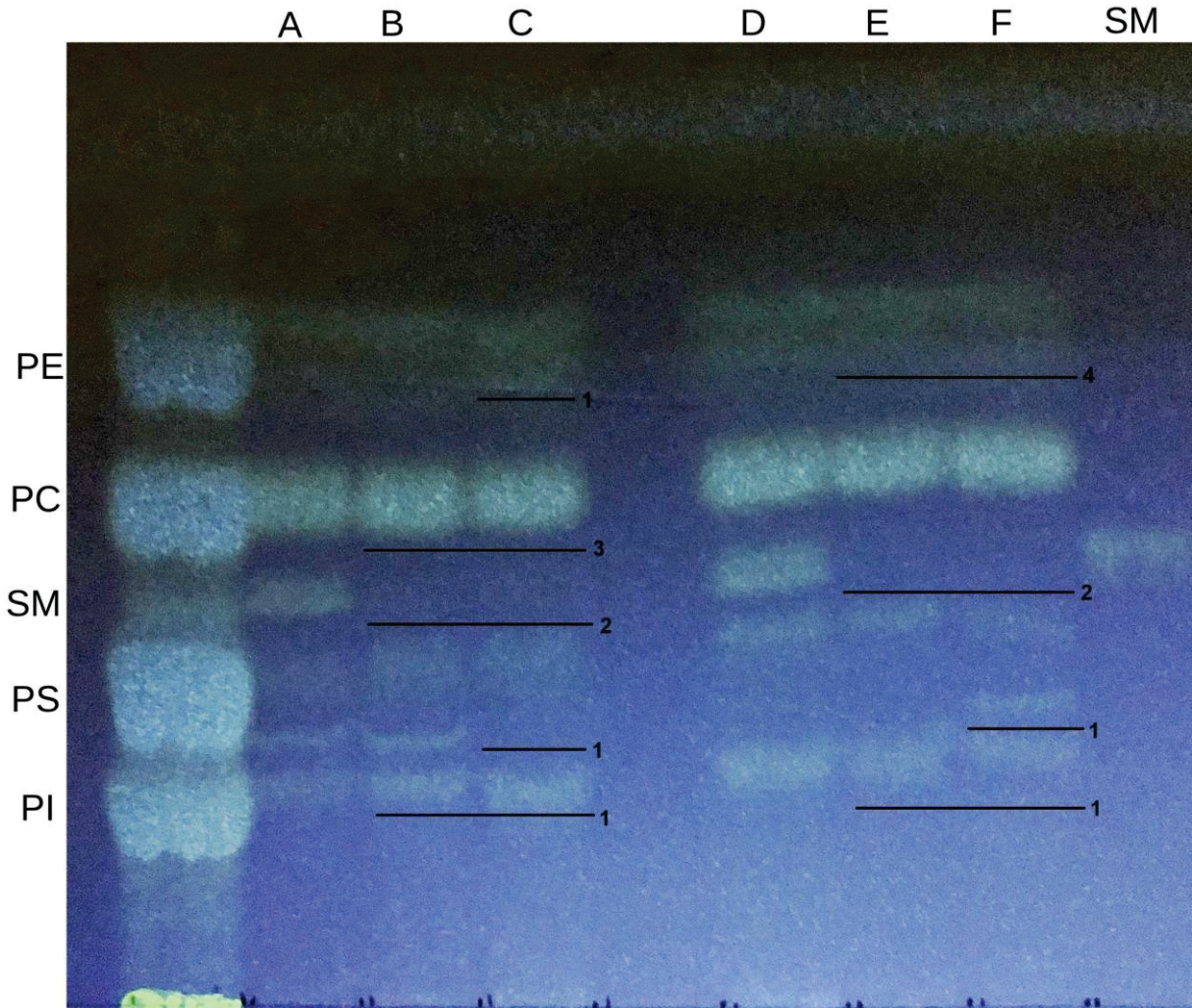
É possível visualizar diversas alterações ao longo do tempo tanto em HFF-1 quanto em HaCaT que não acompanham os padrões, evidenciados pelas linhas identificadas com o número 1, com necessidade de identificação de qual lipídio está sendo alterado ou se essas alterações poderiam ser metabólitos secundários aumentados. As limitações do HPTLC não permitem uma avaliação mais profunda, por isso fazer uso de técnicas de maior seletividade e sensibilidade, como espectrometria de massas, permitiria que essas diferenças fossem melhor explanadas, afinal as diferenças se mostram mais intensas com o passar do tempo.

Com relação às condições da linhagem de fibroblastos humanos HFF-1 a coluna A refere-se a células controle e foi possível identificar uma banda muito leve referente a PE, uma banda intermediária referente a PC, uma banda intermediária referente a SM e também bandas leves referentes a PS e PI. Com relação às condições da linhagem de queratinócitos humanos a coluna D refere-se a células controle e foi possível identificar uma banda muito leve referente a PE, uma banda intensa referente a PC, uma banda intensa referente a SM e banda intermediária referente a PI.

Com relação a esfingomielina foi possível ver uma diminuição das bandas, evidenciados pelas linhas identificadas com número 2 em ambas as linhagens, sendo que após 1 hora de incubação da linhagem HaCaT (E) foi ainda mais visível do que em HFF-1 (B). Há um aumento na intensidade de marcação das bandas de PC (fosfatidilcolina), evidenciados pela linha com número 3 em HFF-1 (B e C) que por sua

vez em HaCaT não se mostra alterada (E e F). Há um leve aumento nas bandas de ceramida na parte superior da banda referência de PE e a intensidade da banda é maior em HaCaT (E e F), evidenciados pela linha com número 4.

Figura 31. Composição lipídica analisada por cromatografia em camada delgada de alto desempenho em fibroblastos humanos (HFF-1) e queratinócitos humanos (HaCaT) incubados com toxina recombinante por 1 hora e 2 horas.



Legenda: Análise da composição da membrana plasmática das linhagens HFF-1 e HaCaT para identificação de fosfolípidios após coloração com primulina. A coluna 1 apresenta os padrões de perfil cromatográfico de fosfolípidios, incluindo fosfoetanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SM). A coluna 8 mostra o padrão cromatográfico específico de esfingomielina (SM). As amostras A, B e C referem-se à linhagem HFF-1, sendo: controle (A), incubação de 1 hora com LiRecDT1 25 µg/ml (B) e incubação de 2 horas com LiRecDT1 25 µg/ml (C). As amostras D, E e F referem-se à linhagem HaCaT, sendo: controle (D), incubação de 1 hora com LiRecDT1 25 µg/ml (E) e incubação de 2 horas com LiRecDT1 25 µg/ml (F).
Fonte: A autora (2024).

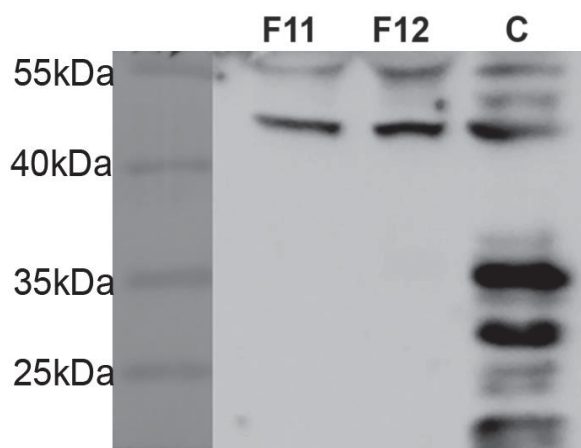
4.13 REAÇÃO DE *IMUNOBLOTTING* PARA ANÁLISE DE ISOLAMENTO DE LISOSSOMOS

Para um melhor entendimento de um possível endereçamento de fosfolipase-D de *Loxosceles intermedia* para lisossomos, foi utilizada a linhagem de endotélio de aorta de coelho, RAEC, com a metodologia apresentada nos itens 3.7 e 3.23 da seção material e métodos. Foi realizado o isolamento de lisossomos destas células, por centrifugação diferencial, com o objetivo de identificar proteínas atreladas ao processo autofágico como LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) e LAMP-2 (*Lysosomal-associated membrane protein 2*).

Após as amostras serem submetidas a corrida eletroforética, foram transferidas para membrana de nitrocelulose e por último foram submetidas a reação de imunomarcção buscando a identificação das proteínas F-actina com massa molecular equivalente a 42 kDa, LAMP-1 com massa molecular equivalente a 110 kDa, LAMP-2 com massa molecular equivalente a 100 kDa e catepsina D com massa molecular equivalente a 52 kDa. A reação imunogênica foi detectada com o auxílio do anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase por 1 hora.

Na FIGURA 32, a amostra controle identificada pela letra C, equivale a um extrato celular de RAEC. As colunas F11 e F12 são amostras do isolamento de lisossomos proveniente das RAECs na condição controle deste trabalho, ou seja, células que após 24 horas do plaqueamento, com 70% - 80% de confluência, foram submetidas à privação de nutrientes, sem SFB, por 16 horas. Em ambas as frações foi possível identificar a presença da proteína F-actina, comprovando a eficácia do ensaio de isolamento.

Figura 32. Análise representativa de Western blotting de lisossomos isolados de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC).

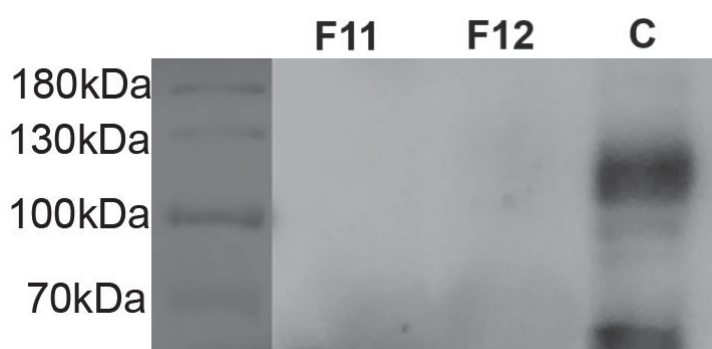


Legenda: Linhagem de células endoteliais da aorta de coelho (RAEC), após isolamento de lisossomos com foco nas frações 11 (F11) e 12 (F12), utilizando um extrato celular da mesma linhagem como controle (C), analisadas por *Western blotting* para identificação da proteína F-actina, com massa molecular de 43 kDa. A detecção dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase foi realizada pelo método de quimioluminescência.

Fonte: A autora (2024).

Assim como na FIGURA 32, a FIGURA 33 evidencia a amostra controle (C) que equivale a um extrato celular de RAEC, e as colunas F11 e F12 são amostras provenientes de duas frações, 11 e 12 respectivamente, do isolamento de lisossomos na condição controle. Em ambas as frações não foi possível identificar a presença da proteína LAMP-1, como era esperado.

Figura 33. Análise representativa de Western blotting de lisossomos isolados de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC).



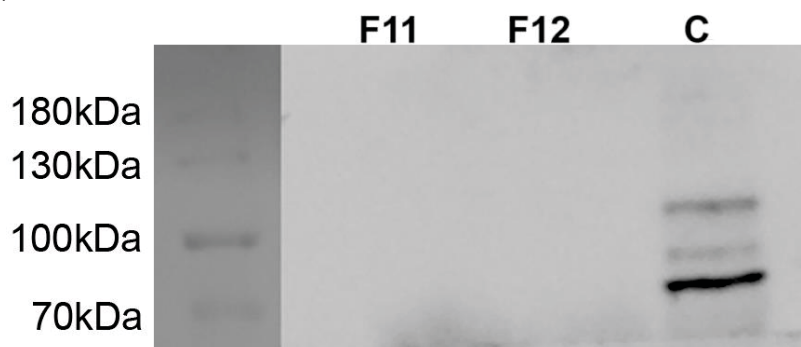
Legenda: Linhagem de células endoteliais da aorta de coelho (RAEC) analisada após isolamento de lisossomos, focando nas frações 11 (F11) e 12 (F12), com um extrato celular da mesma linhagem como controle positivo (C). A análise foi realizada por *Western blotting* para identificação da proteína LAMP-1, com massa molecular de 110 kDa. A detecção dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase foi efetuada pelo método de quimioluminescência.

Fonte: A autora (2024).

A FIGURA 34, tem as mesmas configurações de amostras: controle (C) e frações 11 e 12 do ensaio de isolamento de lisossomos na condição controle. Em

ambas as frações não foi possível identificar a presença da proteína LAMP-2, como era esperado.

Figura 34. Análise representativa de Western blotting de lisossomos isolados de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC).

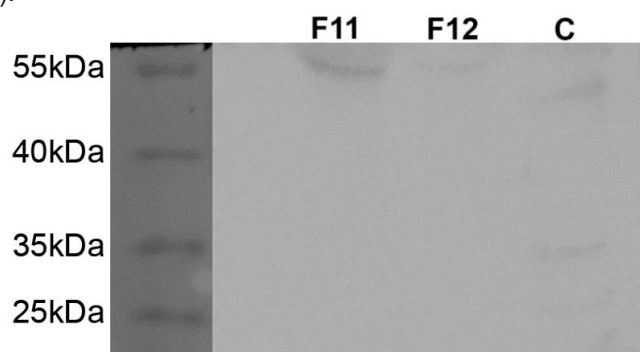


Legenda: Linhagem de células endoteliais da aorta de coelho (RAEC) analisada após isolamento de lisossomos, com foco nas frações 11 (F11) e 12 (F12), utilizando um extrato celular da mesma linhagem como controle positivo (C). As amostras foram analisadas por *Western blotting* para a identificação da proteína LAMP-2, que apresenta massa molecular de aproximadamente 100 kDa. A detecção dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase foi realizada utilizando o método de quimioluminescência.

Fonte: A autora (2024).

Por fim, a FIGURA 35, com as mesmas configurações de amostras: controle (C) e frações 11 e 12 do ensaio de isolamento de lisossomos na condição controle. Em ambas as frações foi possível identificar a presença da proteína catepsina-D, como era esperado.

Figura 35. Análise representativa de Western blotting de lisossomos isolados de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC).



Legenda: Linhagem de células endoteliais da aorta de coelho (RAEC), após isolamento de lisossomos, focando nas frações 11 (F11) e 12 (F12), utilizando um extrato celular da mesma linhagem como controle positivo (C). As amostras foram analisadas por *Western blotting* para a identificação da proteína catepsina-D, que apresenta massa molecular de aproximadamente 52 kDa. A detecção dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase foi realizada utilizando o método de quimioluminescência.

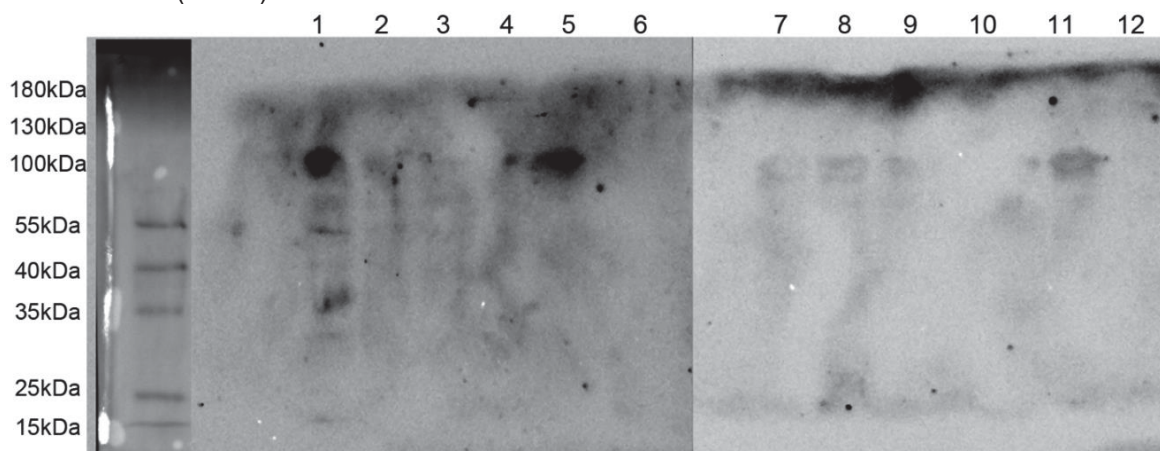
Fonte: A autora (2024).

As FIGURAS 32, 33, 34 e 35 mostram que, nas reações de imunodeteção, os anticorpos estavam ativos, pois a amostra controle (C) detectou as proteínas em todas as reações. No entanto, nas frações que, de acordo com o protocolo de isolamento, deveriam conter proteínas lisossomais foi detectado apenas a proteína catepsina-D. Essa detecção única poderia estar atrelada a um isolamento que não foi completamente bem-sucedido, afinal as membranas lisossômicas poderiam ter sido rompidas, e com isso não detectaria as LAMP-1 e LAMP-2, ou ainda as células analisadas terem sido submetidas a algum estresse, como a supressão de Soro Fetal Bovino, que teria causado um aumento na catepsina-D.

A FIGURA 36 aponta a identificação da proteína LAMP-1 em células endoteliais incubadas com LiRecDT1 50 µg/ml por 1 hora e por 4 horas. As colunas 1 a 4 representam as frações de isolamento das células endoteliais sob condições controle. As colunas 5 a 8 mostram as frações das células incubadas por 1 hora, enquanto as colunas 9 a 12 correspondem às frações das células incubadas por 4 horas, ambas com a toxina recombinante. Para esta análise foram utilizadas as frações de 8 a 11 de cada amostra.

A proteína LAMP-1 foi detectada nas colunas 1, referente à fração 11 do controle, na coluna 5 referente à fração 11 e na coluna 7 referente à fração 9 da incubação de 1 hora com a toxina, nas colunas 9 e 11 referente às frações 11 e 9 respectivamente, da incubação de 4 horas com a toxina recombinante.

Figura 36. Análise representativa de Western blotting de lisossomos isolados de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC).



Legenda: Linhagem de células endoteliais da aorta de coelho (RAEC), após isolamento de lisossomos sob condições controle (1, 2, 3 e 4), incubadas com LiRecDT1 50 µg/ml por 1 hora (5, 6, 7 e 8) e por 4 horas (9, 10, 11 e 12). Análise por *Western blotting* para a identificação da proteína LAMP-1, que apresenta massa molecular de aproximadamente 110 kDa. A detecção dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase foi realizada utilizando o método de quimioluminescência.

Fonte: A autora (2024).

4.14 AVALIAÇÃO DE AUTOFAGIA EM CÉLULA ENDOTELIAL DE AORTA DE COELHO POR IMAGEM ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

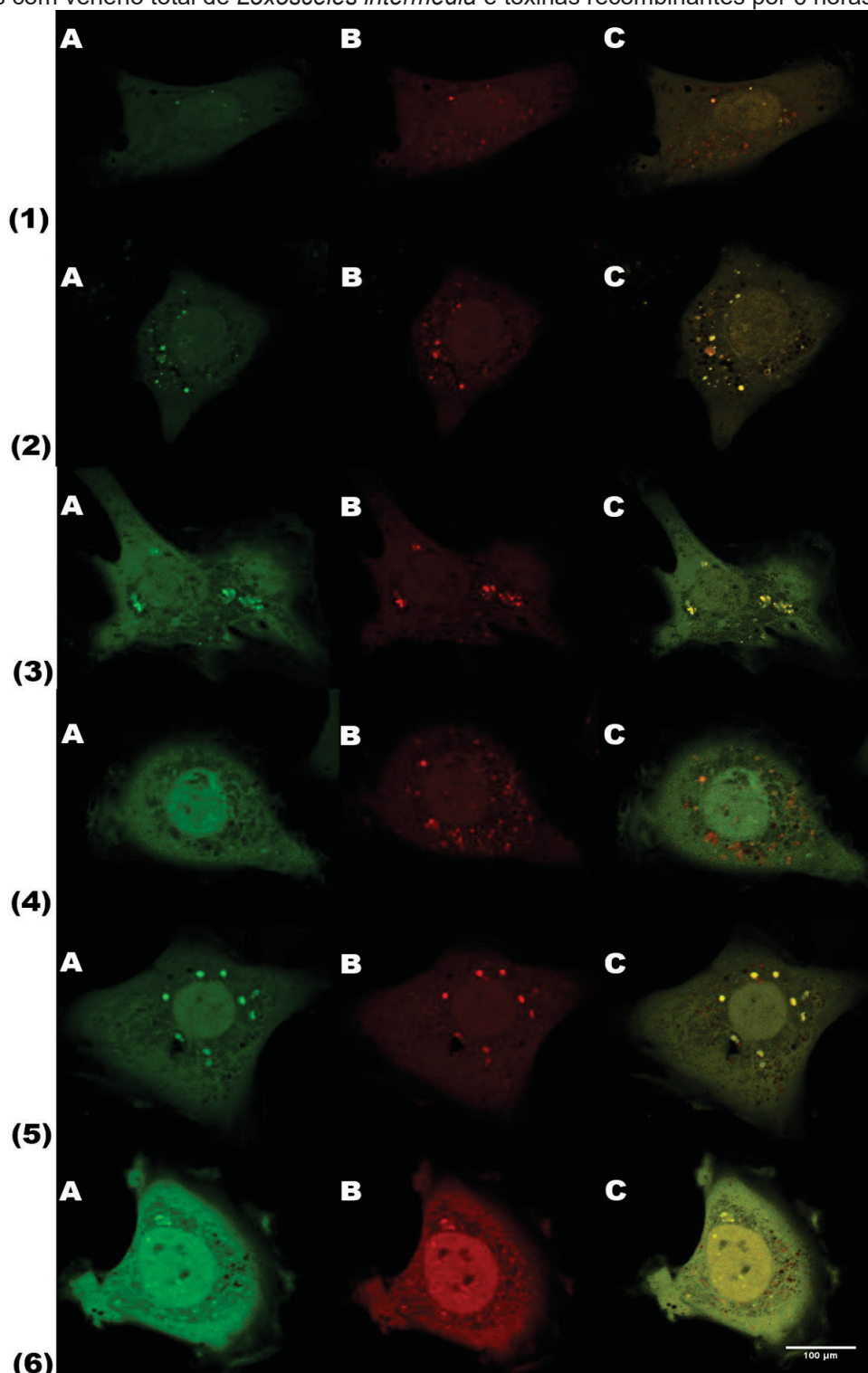
Ainda utilizando a linhagem de endotélio de aorta de coelho RAEC, foi estudado o fluxo autofágico, conforme descrito nos itens 3.7 e 3.22 da seção de “Materiais e Métodos”.

Em condições de aumento do fluxo autofágico, o LC3 é recrutado para a membrana do autofagossomo. Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, a fluorescência da GFP diminui devido ao pH ácido abaixo de 5 do lisossomo, resultando na visualização predominante de pontos vermelhos. Um aumento na quantidade de pontos vermelhos fluorescentes (RFP+GFP-) indica a formação de autolisossomos, enquanto um aumento de pontos amarelos (RFP+GFP+) indica a presença de autofagossomos. O fluxo autofágico é considerado aumentado quando há um aumento tanto nos pontos amarelos quanto nos vermelhos nas células, enquanto o fluxo autofágico é bloqueado quando há um aumento apenas nos pontos amarelos sem um aumento concomitante nos pontos vermelhos nas células (Zhou et al., 2012)

As células RAEC foram expostas a condições de controle, veneno total e toxinas recombinantes, cada uma por um período de 6 horas de incubação. Na FIGURA 37, é possível identificar que "A" indica a fluorescência verde de GFP, "B" indica a fluorescência vermelha de RFP, e "C" representa a fusão das duas fluorescências. Os controles demonstram os seguintes resultados: em 1, o HBSS induziu a autofagia de forma bem-sucedida, evidenciada pela presença de vários agregados vermelhos; em 2, a cloroquina mostrou o padrão esperado de bloqueio autofágico, com a presença de agregados amarelos; e em 3, o controle celular apresentou comportamento normal, sem indução do processo de autofagia, também indicado pela presença de agregados amarelos.

Quando submetidas ao veneno total, as RAEC atingiram o estágio final da autofagia, evidenciado pela formação de autolisossomos (agregados vermelhos). A exposição à LiRecDT1 induziu a autofagia com a formação de autolisossomos, cujos agregados foram menores em tamanho comparados aos observados com o veneno, além da presença de autofagossomos com agregados maiores. Por outro lado, a LiRecDT1 H12A apresentou um padrão semelhante à LiRecDT1, com a presença de autolisossomos e autofagossomos, porém com uma quantidade menor e agregados de tamanho reduzido.

Figura 37. Análise de autofagia na linhagem de células endoteliais da aorta de coelho (RAEC) incubadas com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes por 6 horas.



Legenda: Análise de autofagia por microscopia confocal em células RAEC vivas expostas ao controle positivo (1) - solução salina HANK (HBSS) 500 µl como indutor de autofagia, controle negativo (2) - hidroxicloroquina (HCQ) (100 µM) como inibidor de autofagia, controle (3), veneno total de *Loxosceles intermedia* 50 µg/ml (4), LiRecDT1 50 µg/ml (5), e LiRecDT1 H12A 50 µg/ml (6), após incubação de 6 horas. Imagens da detecção da construção mRFP-GFP-LC3 tandem: GFP (proteína verde fluorescente) (A), RFP (proteína fluorescente vermelha) (B), e imagens mescladas (C). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Zeiss Observer.Z1 e processadas pelo software Slidebook 4.2.0.11 (Intelligent Imaging Innovations, Inc). Barra de escala equivalente a 100 µm.
Fonte: A autora (2019).

5 DISCUSSÃO

Dentre os componentes do veneno, as toxinas mais estudadas e bem estabelecidas são as PLD, que possuem várias isoformas com mecanismos de ação identificados (Appel et al., 2008; Chaim et al., 2006, 2011a; Chaves-Moreira et al., 2011; Lee; Lynch, 2005). Estudos anteriores com a isoforma LiRecDT1, a forma ativa da toxina identificada na glândula de veneno de *Loxosceles intermedia*, submetida a mutação sítio-dirigida resultando em LiRecDT1 H12A, permitiram um melhor entendimento da importância da atividade enzimática e biológica da interação com diferentes alvos/substratos celulares (Chaim et al., 2011a; Chaves-Moreira et al., 2011; Vuitika et al., 2016).

Durante o processo de caracterização das toxinas recombinantes, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ação enzimática das PLD incide sobre os fosfolípidios da membrana celular, resultando em lesões dermonecroticas. Além disso, foi observado que a resposta das PLD é influenciada pela sua atividade enzimática sobre substratos específicos (Chaves-Moreira et al., 2023), ou pelos produtos da clivagem desses substratos (Chaim et al., 2011a; Horta et al., 2013; Rojas et al., 2017). A disparidade na resposta celular diante da toxina modificada His12Ala (H12A) indica que sua afinidade pela ligação lipídica na membrana celular mantém uma resposta residual, de forma tempo e concentração-dependente, causando ligação não homogênea e sem agregação da membrana celular, conforme observado em células endoteliais por Chaim et al. (2011a).

Neste trabalho, após a expressão e purificação das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A (mutada) de *Loxosceles intermedia* (FIGURA 7), foram realizadas análises para comprovar a atividade enzimática dessas toxinas, conforme mostrado no GRÁFICO 1, corroborando com os dados já descritos na literatura (Chaim et al., 2011a).

Durante um processo de envenenamento, os primeiros tipos celulares acometidos são os queratinócitos, células predominantes na epiderme que desempenham funções cruciais, como proteção, manutenção da pele, cicatrização de feridas, além de resposta direta e indireta a patógenos e lesões, contribuindo para a resposta imune. Devido à organização tecidual humana e ao fato de ser um modelo pouco estudado na literatura no contexto de envenenamento por *Loxosceles intermedia* (Corrêa et al., 2016; Desai; Lankford; Warren, 2000; Lopes et al., 2019;

Lopes; Berg; Tambourgi, 2020; Paixão-Cavalcante et al., 2006), a linhagem de queratinócitos humanos HaCaT foi um dos modelos escolhidos.

Para obter informações sobre a resposta metabólica dos queratinócitos humanos, células obtidas durante os primeiros anos da execução deste trabalho, e por se tratar de um tipo celular pouco estudado pelo grupo, diferentes ensaios foram realizados. A quantificação de ATP foi o primeiro ensaio realizado, e os resultados estão apresentados nos GRÁFICOS 2 e 3.

Na concentração de 5 µg/ml de veneno total de *Loxosceles intermedia*, toxina recombinante LiRecDT1 e toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A, os queratinócitos exibiram uma resposta celular semelhante, com aumento na quantidade de ATP ao comparar 1 hora de exposição com 4 horas e de 1 hora para 8 horas. Isso sugere que, nesse intervalo de tempo e concentração, o comportamento celular confirma a ação das toxinas tanto individualmente quanto quando presentes no veneno total. Os dados indicam uma resposta celular adaptativa inicial ao estresse até 4 horas de incubação, durante a qual as células podem estar aumentando a produção de ATP para tentar manter a homeostase.

A partir de 4 horas, as células incubadas com LiRecDT1 continuaram apresentando um aumento significativo no ATP, indicando estresse celular até 8 horas de incubação. A diminuição significativa após 24 horas pode sugerir que as células entraram em um estágio de dano irreversível. As células incubadas com a toxina recombinante LiRecDT1 H12A mostraram uma diminuição considerável no ATP de 8 horas para 24 horas, indicando que sua atividade enzimática, mesmo residual, também pode causar danos irreversíveis às células.

Com 10 µg/ml de veneno total de *Loxosceles intermedia*, toxina recombinante LiRecDT1 e toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A, os queratinócitos tiveram a mesma resposta celular, com aumento na quantidade de ATP comparando 1 hora de exposição com 4 horas nas três condições, indicando uma resposta rápida das células.

Dentre as três condições, apenas as células incubadas com a toxina recombinante LiRecDT1 H12A mostraram uma diminuição considerável no ATP de 8 horas para 24 horas, comportamento similar ao observado nas células tratadas com 5 µg/ml da mesma toxina. O veneno total e LiRecDT1 demonstraram alterações consideráveis, com diminuição do ATP de 1 hora para 24 horas e de 4 horas para 24 horas, respectivamente, demonstrando uma resposta celular adaptativa inicial ao

estresse até 4 horas de incubação. Após 24 horas, as três condições mostraram uma redução significativa, sugerindo dano irreversível com possível ativação de sinalização para morte celular.

A ação enzimática e biológica da toxina mutada LiRecDT1 H12A foi evidenciada pelo aumento significativo no ATP a partir de 4 horas, indicando estresse celular até 8 horas de incubação. Essa resposta celular foi equivalente à observada nos queratinócitos incubados com a toxina recombinante na concentração de 5 µg/ml.

A partir dos experimentos piloto e com o objetivo de visualizar a linhagem de queratinócitos obtida e trabalhada nos primeiros anos de estudo, foi utilizada a microscopia de contraste de fase para foto documentar a morfologia celular em diferentes concentrações. A concentração de 25 µg/ml foi definida para ser utilizada em todas as condições: veneno total de *Loxosceles intermedia*, LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A.

Embora a ação do veneno seja conhecida sobre diferentes linhagens celulares, foram observadas alterações morfológicas nos queratinócitos através das FIGURAS 8B a 11B por microscopia de contraste de fase. Após 2 horas de incubação (FIGURA 9B), foi observada uma leve alteração morfológica com início de retração citoplasmática. Após 4 horas de incubação (FIGURA 10B), houve diminuição na confluência celular, com as células restantes organizadas em ilhas, apresentando citoplasma alongado e fragmentos celulares. Após 24 horas de incubação (FIGURA 11B), células descoladas da placa puderam ser visualizadas em formato esférico, com alta refringência, além da presença de fragmentos celulares adicionais. Essas alterações ocorreram de forma progressiva e dependente do tempo.

As descrições visualizadas nas figuras citadas anteriormente sugerem que o veneno de *Loxosceles intermedia* causa alterações significativas às células, com indício de estresse celular após 2 horas de incubação, seguido de reorganização de morfologia e metabolismo celulares, bem como da adesão à matriz extracelular. Esses dados corroboram a literatura (Chaim et al., 2011a), que indica que, após 24 horas de incubação, há a presença de células descoladas e fragmentos celulares aumentados. Isso é consistente com o conhecimento da composição do veneno, que inclui várias toxinas atuantes em substratos específicos, afetando a matriz extracelular, proteínas de ligação célula-célula e célula-matriz (Gremski et al., 2021; Veiga et al., 2000), sugerindo morte ou lise celular.

Ao ser analisadas as alterações morfológicas nos queratinócitos incubados com a toxina LiRecDT1 H12A (FIGURAS 8D a 11D), foi observado um aumento de fragmentos celulares a partir de 2 horas de incubação, comparado com a imagem do controle. Após 4 horas de incubação, ainda havia presença de fragmentos celulares, além de alterações morfológicas como retração citoplasmática, citoplasma mais claro que o núcleo e várias células arredondadas. Após 24 horas de incubação, foram visualizadas células alongadas, algumas com citoplasma arredondado, células descoladas e organização do cultivo em ilhas. As alterações observadas foram muito semelhantes às vistas no quadrante tratado com veneno após 24 horas.

Considerando que foi possível visualizar alterações morfológicas tanto nos queratinócitos incubados com LiRecDT1 quanto com LiRecDT1 H12A, similares às observadas nas células incubadas com veneno total, é possível que alterações como reorganização celular, lise celular e possível progressão e indução à morte celular sejam causadas pelas diversas PLD contidas no veneno. O fato de a LiRecDT1 H12A ter induzido alterações nas células após um tempo maior de exposição, mas ainda assim similar aos resultados do veneno, evidencia que, mesmo que uma PLD não seja tão enzimaticamente ativa quanto outra, sua ação sobre a composição lipídica da membrana plasmática dos queratinócitos continua sendo danosa e gradativa a longo prazo. Esses dados corroboram a literatura utilizando células diferentes e evidenciam a ligação de ambas as toxinas à membrana celular (Chaim et al., 2011a).

A morfologia dos fibroblastos humanos (HFF-1) foi analisada e evidenciada nas FIGURAS 12 a 15. Ao examinar a ação do veneno total sobre essa linhagem, as primeiras alterações foram observadas após 4 horas de incubação (FIGURA 13B), com mudanças morfológicas como retração citoplasmática e arredondamento das células. Após 8 horas de incubação (FIGURA 14B), houve um aumento na quantidade de células com alterações morfológicas, com uma maior distinção entre as regiões citoplasmática e nuclear devido à retração da membrana. Essa resposta tornou-se ainda mais evidente após 24 horas de incubação (FIGURA 15B), com a maioria das células apresentando morfologia alterada e sinais de descolamento celular, indicados pelo aumento da refração da luz nas regiões centrais das células. Essas alterações ocorreram de forma progressiva e dependente do tempo.

Com base na literatura e nos resultados observados em queratinócitos, a ação do veneno total sobre fibroblastos era esperada e está em conformidade com os estudos existentes. A composição diversificada do veneno total de *Loxosceles*

intermedia, amplamente estudada, indica que a presença de metaloproteases e serinoproteases hidrolisam proteínas da matriz extracelular, resultando no descolamento celular (Gremski et al., 2021; Veiga et al., 2000). Essas proteases afetam componentes essenciais, como fibronectina e fibrinogênio, além de elementos da membrana basal, como entactina e o proteoglicano heparan sulfato, presentes em células endoteliais (Paludo et al., 2006).

Nas FIGURAS 12C a 15C, foi possível observar a ação da toxina LiRecDT1, que demonstrou alterações morfológicas significativas apenas após 24 horas de incubação. Houve uma diferença considerável no cultivo, com evidências de fragmentos celulares e alterações na morfologia citoplasmática. As células apresentaram formatos variados, entre alongados e arredondados, além de muitas células descoladas. As alterações morfológicas observadas, baseadas nas definições do Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular, sugerem comprometimento da integridade celular e possíveis alterações metabólicas, indicando a ativação do processo de morte celular (Kroemer et al., 2009)

Nas FIGURAS 12D a 15D, foi possível observar a ação da toxina LiRecDT1 H12A, que segue um padrão de ação dependente do tempo semelhante ao da toxina enzimaticamente ativa. As alterações morfológicas e danos foram observados após 24 horas de incubação, ainda que em menor intensidade aparente. Esses dados corroboram a literatura (Chaim et al., 2011a) e indicam que, embora a atividade enzimática dessa toxina seja reduzida, sua ação biológica sobre as células causa danos.

As respostas celulares diferentes, dependentes do tempo, observadas entre queratinócitos e fibroblastos expostos ao veneno e às toxinas levantaram questões sobre o metabolismo, a composição celular e a ativação de autofagia ou outro processo de morte celular. De acordo com a literatura, os queratinócitos possuem grânulos internos contendo componentes lipídicos como ceramidas, colesterol e ácidos graxos, essenciais para a proteção epitelial quando liberados no espaço intercelular. Em contraste, os fibroblastos, conhecidos por sua alta capacidade de síntese e baixa reserva, desempenham um papel fundamental na produção de colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos, que são os principais constituintes da matriz extracelular (Ross; Pawlina, 2012).

Ao submeter os queratinócitos ao ensaio de captação de vermelho neutro, apenas a incubação com veneno total resultou em uma diminuição estatisticamente

significativa de 1 hora para 4 horas. Essa alteração sugere perda de integridade celular e alteração de pH, possivelmente devido ao aumento da atividade autofágica nas células. Estudos anteriores demonstraram que a autofagia pode afetar a acidificação lisossômica, comprometendo a capacidade dos lisossomos de manter um pH ácido adequado para a retenção do vermelho neutro. Portanto, sugerimos que a redução na captação de vermelho neutro indica um estado aumentado de fluxo autofágico nas células, que poderia servir como um sinal para a sobrevivência ou morte celular, de acordo com o tempo de exposição (Mahapatra et al., 2021; Qiang et al., 2021).

Outro estudo para entender as reações bioquímicas das células foi realizado utilizando o ensaio de MTT. As evidências no GRÁFICO 5 mostram que, após 16 horas de incubação, os queratinócitos em todas as condições demonstraram um aumento estatisticamente significativo no metabolismo celular em comparação com aquelas logo após a adição do veneno total e toxinas. Esse aumento no metabolismo celular pode indicar uma tentativa das células de compensar os danos causados pelas condições às quais foram expostas, possivelmente representando um estado transitório de adaptação celular. No entanto, morfologicamente, após 24 horas de incubação, todas as condições evidenciaram danos consideráveis à linhagem celular.

No GRÁFICO 6, os resultados para as células da linhagem HFF-1 mostram um aumento significativo no metabolismo celular nas células incubadas com LiRecDT1, tanto de 1 hora a 6 horas quanto de 6 horas a 16 horas de incubação. Esses dados bioquímicos corroboram os resultados obtidos por microscopia de contraste de fase, que até então apresentavam poucas alterações morfológicas após 4 horas de incubação e não permitiam uma categorização clara sobre a existência de um processo de dano ou indução à morte celular (Galluzzi et al., 2012; Kroemer et al., 2009).

Ainda avaliando a resposta bioquímica, os queratinócitos foram submetidos a uma análise de coloração com o corante cristal violeta para detectar a manutenção da aderência das células. No GRÁFICO 7, é possível identificar que veneno total e LiRecDT1 H12A não apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados. Por outro lado, células incubadas com LiRecDT1 mostram um aumento significativo de células aderidas de 4 horas a 6 horas de incubação, indicando uma possível resposta de sobrevivência celular. No entanto, ao comparar a diminuição significativa de 1 hora para 16 horas, bem como de 4 horas para 16 horas,

é possível sugerir que, após 16 horas, essas células perderam a integridade de membrana e estão suscetíveis à morte celular.

Com base nas diferentes respostas observadas nas alterações da morfologia celular entre as diversas linhagens, foi realizada uma análise de microscopia confocal com fibroblastos humanos HFF-1 para examinar a ligação da toxina LiRecDT1-GFP (25 µg/ml). Na FIGURA 21, observamos uma baixa quantidade de toxina ligada à membrana nas primeiras horas de incubação. Com o passar do tempo, essa ligação aumentou, embora ainda em quantidades reduzidas, o que está de acordo com os resultados obtidos pela microscopia de contraste de fase. As FIGURAS 22 e 23 apresentam resultados semelhantes aos da FIGURA 21, com a diferença de que mostram o campo fotografado por completo, enquanto a FIGURA 21 apresenta apenas um recorte do campo.

Além de observar a ligação da toxina LiRecDT1-GFP na membrana plasmática, foi possível constatar a internalização da toxina nas células HFF-1 pela presença de agregados no interior das células, conforme mostrado na FIGURA 24. Esse achado destaca a influência significativa do tempo na resposta celular, evidenciando que a toxina inicialmente se fixa à membrana celular. No entanto, não está claro se essa ligação é estática ou dinâmica, uma vez que algumas toxinas permanecem na membrana enquanto outras são internalizadas. As FIGURAS 25 e 26 confirmam esses resultados, mostrando o campo completo fotografado, enquanto a FIGURA 24, apresenta apenas um recorte do campo.

Os resultados da adesão da toxina à membrana celular neste estudo corroboram com os achados de Paludo et al. (2006) e Nowatzki et al. (Nowatzki et al., 2012) que demonstraram a interação e internalização do veneno total de *Loxosceles intermedia* pela membrana celular de células endoteliais de coelho (RAEC). Esses estudos também relataram alterações na distribuição das integrinas $\alpha 5\beta 1$, VE-caderinas, além de mudanças morfológicas que resultaram na perda da adesão célula-célula.

Diante dos achados da microscopia confocal, surgiu a questão sobre o potencial impacto da internalização da toxina nas células e o papel da composição lipídica celular em sua interação com a membrana. Para aprofundar a compreensão, foi realizada uma cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC) para uma melhor separação e detecção de compostos de ambas as linhagens.

Os resultados apresentados na FIGURA 31 evidenciaram diferenças na composição da membrana plasmática entre queratinócitos e fibroblastos. Nos campos controle, foi possível observar uma diferença na intensidade das bandas indicativas de esfingomielina nas linhagens, demonstrando que os queratinócitos possuem uma maior quantidade de esfingomielina em sua composição de membrana. Foi observada uma diminuição nas bandas de esfingomielina em ambas as linhagens celulares após a incubação. Essa diminuição foi mais pronunciada na linhagem HaCaT logo após 1 hora de incubação, devido à maior composição inicial de esfingomielina. A diferença na redução das bandas de esfingomielina pode indicar que, em queratinócitos, a composição da membrana ou a acessibilidade do substrato são mais favoráveis à ação da fosfolipase.

Além disso, os resultados indicaram um leve aumento na intensidade das bandas de ceramida em queratinócitos. Esse aumento é uma consequência da hidrólise da esfingomielina, que gera ceramida como metabólito lipídico secundário (Lee; Lynch, 2005), afetando a homeostase lipídica. Esses produtos secundários podem ativar e sinalizar vias relacionadas a diversas alterações fisiopatológicas (Moolenaar; Van Meeteren; Giepmans, 2004), atuando também como moléculas de sinalização que induzem a autofagia. Em condições de estresse, a ceramida pode promover a autofagia como um mecanismo de sobrevivência celular, permitindo a degradação de componentes danificados e a reciclagem de nutrientes (Hannun; Obeid, 2008)

Ao analisar a constituição inicial de fosfatidilcolina em ambas as linhagens, verificou-se que os queratinócitos apresentaram uma banda mais pronunciada que os fibroblastos. Após 1 hora e 2 horas de incubação com a toxina recombinante, a linhagem HFF-1 apresentou um aumento na intensidade das bandas de PC, enquanto em HaCaT a PC não mostrou alterações. Esse resultado demonstra que, na presença de fosfolipase, os fibroblastos resultam na formação de mais fosfatidilcolina ou pode ainda ocorrer uma alteração na distribuição ou exposição de PC que torna a banda mais pronunciada. A fosfolipase pode ter promovido a liberação de fosfatidilcolina de reservas intracelulares ou de membranas internas, aumentando a quantidade detectável de PC nesses fibroblastos. Por saber-se que a fosfolipase não hidrolisa a PC (Chaves-Moreira et al., 2023), entende-se o porquê de as bandas de PC não terem sofrido alterações em queratinócitos.

Um estudo visando aprimorar *kits* de reconstrução da pele analisou a composição da membrana celular de queratinócitos, levando em consideração a arquitetura tecidual, a expressão de marcadores de diferenciação específicos e a organização lipídica, conforme evidenciado por Schurer (1991). Os resultados da análise quantitativa das moléculas revelaram que os kits de pele sintética apresentam uma composição muito semelhante à do tecido normal, que inclui aproximadamente 37% de fosfolipídios, 12% de ceramidas e 17% de colesterol, entre outros componentes (Ponec et al., 2002).

A fim de aprofundar a compreensão das possíveis alterações na membrana celular, foi realizado o ensaio de extrato de membrana celular, utilizando a linhagem de endotélio de aorta de coelho, cuja presença da fosfolipase-D foi identificada, conforme FIGURA 16, inclusive com aumento na detecção conforme aumento de tempo de exposição. Resultado este que, ainda que já apresentado na literatura, neste trabalho corrobora aos dados obtidos por microscopia confocal utilizando queratinócitos humanos, os quais evidenciaram aumento da ligação da toxina de forma tempo dependente.

Na sequência, foi adotada a técnica de isolamento de membrana celular, seguida de precipitação proteica. O objetivo principal era investigar o impacto da ação da toxina ativa na reorganização das balsas lipídicas em cada tipo celular. Neste ensaio foi confirmado o sucesso do ensaio pela identificação da proteína Caveolina-1, conforme FIGURA 17, marcador de balsas lipídicas. Na FIGURA 18 a proteína constitutiva GAPDH foi identificada. Apesar da etapa de padronização ter sido realizada, não obtivemos resultados que evidenciassem a reorganização de membrana celular, mais especificamente das balsas lipídicas em queratinócitos humanos. Nas demais linhagens celulares, o ensaio não foi aplicado.

Para investigar as respostas de queratinócitos e fibroblastos em relação à citotoxicidade, viabilidade celular e possíveis sinalizações para a morte celular, foi utilizada a citometria de fluxo para avaliar marcadores estabelecidos de morte celular. A fosfatidilserina (PS) é exposta na membrana celular desde o início da fase de execução da apoptose até a formação dos corpos apoptóticos finais. Nas células mortas, a exposição de PS na camada interna da membrana permite a ligação da Anexina-V, aplicada externamente, indicando a perda de integridade da membrana plasmática. Quando ocorre essa perda, a célula torna-se positiva para Anexina-V, um marcador da fase necrótica da célula (van Engeland et al., 1998). Além disso, foi

utilizado o 7-AAD, que indica os estágios finais da apoptose ou o início da necrose, quando ocorre a permeabilização precoce da membrana celular. A dupla marcação celular com Anexina-V e 7-AAD indica um processo ativo de necrose.

Nos GRÁFICOS 8 a 10, foi analisado o comportamento dos queratinócitos em relação à morte celular. No GRÁFICO 8, os dados do índice de Anexina-V não revelaram diferença estatisticamente significativa entre as condições avaliadas nos tempos analisados. No GRÁFICO 9, os dados do índice de 7-AAD mostraram que o LiRecDT1 não apresentou diferença estatisticamente significativa ao longo dos tempos avaliados. Por outro lado, as células incubadas com veneno total e LiRecDT1 H12A mostraram um aumento significativo nos eventos de 16 horas para 24 horas.

No GRÁFICO 10, os dados do índice de dupla marcação revelaram que o veneno total e o LiRecDT1 H12A não apresentaram diferença estatisticamente significativa, enquanto o LiRecDT1 mostrou uma diminuição significativa nos eventos marcados, tanto de 6 horas para 24 horas quanto de 16 horas para 24 horas. Essa redução, associada aos resultados da microscopia de contraste de fase, sugere que as células iniciaram o processo de morte a partir das 6 horas, intensificando-se em 16 horas, e que após 24 horas, a densidade celular foi insuficiente para permitir a marcação com Anexina-V e 7-AAD.

É sabido que o processo necrótico, avaliado neste trabalho pela marcação concomitante com Anexina-V e 7-AAD, pode ocorrer de forma regulada, também chamada de necroptose, que apresenta sinais relacionados à estruturação de processos fisiológicos e patológicos. Alterações como dano ao DNA, a presença de excitotoxinas, ativação de receptores de morte e inibição de certas caspases (particularmente a caspase-8) por manipulação genética ou agentes farmacológicos, podem ativar a execução da morte celular necrótica regulada. A necrose regulada está envolvida principalmente na ativação de receptores de TNF, como TNFR1 (Galluzzi et al., 2012). Por outro lado, TNF ativado, em queratinócitos de camundongo, estimula o fluxo autofágico e a expressão de genes relacionados à autofagia através do NFKB (Qiang et al., 2021).

O estudo de Dantas et al. (2014), utilizando fibroblastos e veneno total de *L. similis* com incubação das células por 48 horas, demonstra a ativação das caspases, impedindo a reversibilidade do processo de morte celular. Em nosso estudo, observamos que as células são inicialmente danificadas. No entanto, há indícios de que algum mecanismo protetivo celular pode ser ativado, tornando-as resistentes à

morte celular quando expostas diretamente à toxina ou ao veneno total de *Loxosceles intermedia*.

Segundo o periódico *Cell Death and Differentiation*, a ativação de caspases não é obrigatória em vários casos de apoptose *in vitro*. Além disso, a exposição de fosfatidilserina (PS) não é exclusiva da morte celular por apoptose. Dependendo dos níveis, pode indicar outras formas de morte celular, e há indicações de que essa exposição não ocorre em células deficientes em autofagia que passam por apoptose (Galluzzi et al., 2012).

Além dos processos de morte celular mencionados, a autofagia também desempenha um papel crucial, atuando inclusive na etapa anterior à morte celular. Quando ativada fisiologicamente (*in vivo*), a autofagia pode direcionar algumas células à morte ou estar relacionada à sobrevivência celular. Em células cancerosas, esse processo frequentemente está intensamente ativo, sendo um mecanismo adaptativo ao estresse celular. A autofagia induzida por estresse geralmente exerce funções citoprotetoras, facilitando o restabelecimento da homeostase e a sobrevivência celular. Alterações morfológicas, como a vacuolização citoplasmática maciça, são indicativas da ativação desse processo em células *in vitro*. Segundo o NCCD (*Nomenclature Committee on Cell Death*), todas as mortes celulares que apresentam marcadores de autofagia ativados, mas não podem ser bloqueadas pela via autofágica, são consideradas mortes autofágicas (Galluzzi et al., 2012).

Com o intuito de analisar lisossomos e obter maiores entendimentos sobre possibilidade de endereçamento de fosfolipases, a pesquisa utilizando a linhagem RAEC evidenciou através da FIGURA 32, com a identificação da proteína F-actina, a efetividade do ensaio. Apesar de não terem sido identificadas as proteínas LAMP-1 e LAMP-2, em células sem condições estressantes, foi possível identificar a proteína catepsina-D conforme FIGURA 35. Por fim, a FIGURA 36 comprova que células endoteliais incubadas com a fosfolipase-D recombinante apresenta uma quantidade de lisossomos diferenciada, sendo possível identificar os marcadores clássicos de lisossomos nas frações 9 e 11, diferentemente das células controle, sem tratamento, que apresentam apenas a fração 11 marcadas com LAMP-1. Esse resultado sugere que haja um direcionamento das fosfolipases-D aos lisossomos, ou ainda que estas causem um estresse intenso na célula a ponto de ter os níveis de lisossomos aumentados.

Seguindo o processo de investigação de rota da fosfolipase, ou efeitos causados por ela, a FIGURA 37 proporcionou um melhor entendimento do comportamento do endotélio diante da ação do veneno total e toxinas recombinantes frente a ativação autofágica. A observação da intensa formação de autolisossomos sugere que o veneno induz um estágio avançado do processo autofágico celular, sugerindo que essa via pode ser responsável pela morte celular induzida pelo veneno (Galluzzi et al., 2012; Klionsky et al., 2021). Além disso, a presença de autolisossomos frequentemente indica processos de remodelagem celular, adaptação ao estresse ou mesmo desregulação da degradação celular em condições patológicas (Klionsky et al., 2021).

A presença tanto de autolisossomos quanto de autofagossomos em RAEC induzidos por toxinas recombinantes sugere o envolvimento dessas estruturas no fluxo autofágico causado pelo veneno, embora não sejam as únicas responsáveis pelo conteúdo proteico do veneno. A análise individual dessas PLDs indica uma resposta adaptativa das células na tentativa de remover componentes celulares danificados (Klionsky et al., 2021). No entanto, a variabilidade nos resultados sugere diferentes graus de eficácia na indução da autofagia, que podem estar relacionados à atividade enzimática de cada toxina, e possivelmente à indução de morte celular.

Existe a hipótese de que as células estudadas neste trabalho possam estar apresentando alterações na expressão e secreção da proteína HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*). Esta proteína, que normalmente reside no núcleo celular e desempenha funções na regulação da estrutura cromossômica e na resposta ao dano celular, pode ser ativamente secretada no citosol em resposta a processos de morte celular ou injúrias. A HMGB1, ao ser liberada para o meio extracelular, age como um padrão molecular associado ao dano (DAMP, do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern*), interagindo com outros fatores e desempenhando papéis variados como quimiocina, citocina e fator de crescimento. Além disso, a translocação da HMGB1 do núcleo para o citosol pode regular positivamente a autofagia, e sua ausência pode inibir esse processo, potencialmente aumentando a ocorrência de apoptose (Kang et al., 2014).

Os resultados deste estudo evidenciam que tanto a toxina ativa LiRecDT1 quanto a mutante LiRecDT1 H12A exercem atividade enzimática e biológica sobre os fosfolipídios da membrana celular, resultando em danos significativos aos queratinócitos e fibroblastos, embora com variações na intensidade e no tempo de

resposta. Inicialmente, as células apresentaram uma resposta adaptativa ao estresse, caracterizada pelo aumento na produção de ATP e no metabolismo celular durante aproximadamente 4 horas de exposição às toxinas. Contudo, após esse tempo, os danos celulares se acentuaram, com redução do ATP e alterações morfológicas progressivas que indicam morte celular iminente.

A maior sensibilidade dos queratinócitos pode estar relacionada à sua composição aumentada de esfingomielina na membrana celular e sua função na matriz extracelular, enquanto a resposta menos pronunciada dos fibroblastos sugere uma reserva lipídica menor ou menos acessível. A ação das toxinas resultou em retração citoplasmática, descolamento celular, aumento na exposição de fosfatidilserina (indicativa de morte celular programada) e possivelmente indução de autofagia, revelando múltiplos mecanismos de dano celular. Esses achados, juntamente com os achados de autofagia em RAEC, contribuem significativamente para o entendimento dos mecanismos de ação das PLDs no contexto do envenenamento por *Loxosceles intermedia* no nível celular, transcendendo a simples atividade enzimática direta, e podem orientar investigações futuras e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos objetivos deste trabalho podemos concluir que:

A expressão e purificação de toxinas recombinantes da família das fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia* foram realizadas de forma eficaz;

As alterações morfológicas de ambas as linhagens foram analisadas sob o efeito do veneno total de *Loxosceles intermedia* e das toxinas fosfolipases-D recombinantes, verificando a diferença de respostas entre elas;

As alterações bioquímicas de ambas as linhagens foram avaliadas quanto ao potencial citotóxico sobre cada tipo celular, frente à ação do veneno total e das toxinas fosfolipases-D recombinantes;

As alterações bioquímicas sobre a membrana celular de ambas as linhagens foram analisadas após ação do veneno total e das toxinas fosfolipases-D recombinantes por indução à morte celular;

Foram analisadas as alterações na composição de membrana celular de ambas as linhagens após ação do veneno total e das toxinas fosfolipases-D recombinantes;

Não foi possível analisar o conteúdo liberado pelas células expostas ao veneno total e fosfolipase-D de aranha-marrom, no contexto inflamatório, em ensaios de cultivo e co cultivo *in vitro*.

Não foram realizados os ensaios que permitiriam a análise da interação entre queratinócitos e fibroblastos no contexto inflamatório induzido por veneno total e fosfolipase-D em ensaios de migração em cultivo celular.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O modelo experimental proposto busca a melhoria no entendimento da resposta de interação entre as células afetadas, em uma abordagem que permita a compreensão celular e molecular da modulação disparada como consequência da ação de uma das PLD de *Loxosceles intermedia* ao longo do percurso entre as células, para tanto foram utilizadas informações previamente fundamentadas na literatura que mostram alterações *in vivo* e *in vitro* ocorridas após minutos de contato do veneno ou toxinas loxoscélicas.

Para avançar continuamente na ciência, sugere-se que os próximos trabalhos abordem os pontos destacados na TABELA 1 abaixo.

Tabela 1. Recomendações para trabalhos futuros utilizando veneno total de *Loxosceles intermedia* e LiRecDT1 utilizando linhagens de queratinócitos e fibroblastos humanos.

Queratinócitos - HaCaT	Fibroblastos - HFF-1
Analisar o conteúdo liberado pelos queratinócitos expostos ao veneno total e fosfolipase-D de aranha-marrom, no contexto inflamatório, em ensaios de cultivo e co cultivo <i>in vitro</i> com fibroblastos;	Analisar o conteúdo liberado pelos fibroblastos expostos ao veneno total e fosfolipase-D de aranha-marrom, no contexto inflamatório, em ensaios de cultivo e co cultivo <i>in vitro</i> com queratinócitos;
Análise, por microscopia confocal, da ligação e internalização de LiRecDT1-GFP;	
Identificar a toxina LiRecDT1 em frações celulares enriquecidas com balsas lipídicas utilizando a metodologia de fracionamento previamente padronizada.	
Análise de metabólito secundário à hidrólise da PLD;	
Análise de ativação autofágica;	
Análise de expressão dos genes CXCL1, CCL2, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , NF κ β , AK, HMGB1 e GAPDH	
Identificação de todos os componentes da membrana celular e as alterações sofridas após ação da toxina ativa, por espectrometria de massas.	
Modulação celular com queratinócitos e fibroblastos cultivados em co cultivo.	
Análise de comunicação celular com fibroblasto;	Análise de comunicação celular com queratinócito;

Análise de microvesículas e/ou exossomos em cultivo individual;	
Análise de microvesículas e/ou exossomos em cultivo de queratinócitos co cultivados com fibroblastos.	Análise de microvesículas e/ou exossomos em cultivo de fibroblastos co cultivados com queratinócitos.

REFERÊNCIAS

- APPEL, M. H. et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 2, p. 167–178, fev. 2008.
- ATTOUB, S. et al. Captopril as a Potential Inhibitor of Lung Tumor Growth and Metastasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1138, n. 1, p. 65–72, 29 set. 2008.
- BAE, J.-S. et al. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 3909–3916, 1 dez. 2007.
- BAE, J.-S.; YANG, L.; REZAIE, A. R. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 8, p. 2867–2872, 20 fev. 2007.
- BARBARO, K. C. et al. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 972–979, nov. 2010.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 127–152.
- BERTONI DA SILVEIRA, R. et al. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241–1253, set. 2006.
- BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 3, p. 761–771, 1 mar. 1988.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRANDENBURG, L.-O.; PUFE, T.; KOCH, T. Role of Phospholipase D in G-Protein Coupled Receptor Function. **Membranes**, v. 4, n. 3, p. 302–318, 3 jul. 2014.

BUMPUS, T. W.; BASKIN, J. M. Clickable Substrate Mimics Enable Imaging of Phospholipase D Activity. **ACS Central Science**, v. 3, n. 10, p. 1070–1077, 25 out. 2017.

BUONASSISI, V. Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. **Experimental Cell Research**, v. 76, n. 2, p. 363–368, fev. 1973.

CALABRIA, P. et al. Design and Production of a Recombinant Hybrid Toxin to Raise Protective Antibodies against *Loxosceles* Spider Venom. **Toxins**, v. 11, n. 2, p. 108, 12 fev. 2019.

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

CHAIM, O. M. et al. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 2, p. 84–96, fev. 2011a.

CHAIM, O. M. et al. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, v. 3, n. 3, p. 309–344, 22 mar. 2011b.

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

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase- D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 655–666, 19 jul. 2009.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2529–2540, 18 set. 2011.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 6, 8 dez. 2017.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Brown Spider Venom Phospholipase-D Activity upon Different Lipid Substrates. **Toxins**, v. 15, n. 2, p. 109, 27 jan. 2023.

CORRÊA, M. A. et al. Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* Venom Induces the Expression of MMP7 in Human Keratinocytes: Contribution to Dermonecrosis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153090, 14 abr. 2016.

DA SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, dez. 2004.

DANTAS, A. E. et al. Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts. **Toxicon**, v. 84, p. 56–64, jun. 2014.

DANTAS, A. E. et al. 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, set. 2016.

DE GIUSEPPE, P. O. et al. Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, n. 4, p. 622–627, jun. 2011.

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

DOS SANTOS, L. et al. Brown Recluse Spider Venom: Proteomic Analysis and Proposal of a Putative Mechanism of Action. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 933–943, 1 ago. 2009.

DRAGULEV, B. et al. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 Dominates Gene Expression in Human Fibroblast Cells Exposed to *Loxosceles reclusa* Sphingomyelinase D: Insights into Spider Venom Dermonecrosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1264–1266, maio 2007.

DUTERTRE, S.; LEWIS, R. J. Use of Venom Peptides to Probe Ion Channel Structure and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 18, p. 13315–13320, abr. 2010.

FEITOSA, L. et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039–1051, jul. 1998.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb.prot087379, 1 abr. 2016.

FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 756–65, set. 2005.

FUKUDA, D. et al. Recombinant Phospholipase-D from *Loxosceles gaucho* Binds to Platelets and Promotes Phosphatidylserine Exposure. **Toxins**, v. 9, n. 6, p. 191, 13 jun. 2017.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRAZIL). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. [s.l.] Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1998.

FUTRELL, N. Lacunar Infarction. **Stroke**, v. 35, n. 7, p. 1778–1779, jul. 2004.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 15 jan. 2012.

GHASEMI, M. et al. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021.

GOMEZ-MUÑOZ, A. et al. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 6, p. 1060–1066, jun. 2013.

GRAHAM, J. M. Isolation of Lysosomes from Tissues and Cells by Differential and Density Gradient Centrifugation. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 7, n. 1, jul. 2000.

GRAZIANI, A. et al. Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A-dependent EDHF formation. **Cardiovascular Research**, v. 64, n. 2, p. 234–242, 1 nov. 2004.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403, 2010.

GREMSKI, L. H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, jun. 2014.

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

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 139–150, fev. 2008.

HORTA, C. C. R. et al. Lysophosphatidic Acid Mediates the Release of Cytokines and Chemokines by Human Fibroblasts Treated with *Loxosceles* Spider Venom. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1682–1685, jun. 2013.

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

KALAPOTHAKIS, E. et al. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 938–946, dez. 2007.

KANG, R. et al. HMGB1 in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 40, p. 1–116, dez. 2014.

KARIM-SILVA, S. et al. Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism. **Immunology Letters**, v. 176, p. 90–96, ago. 2016.

KIMURA, S.; NODA, T.; YOSHIMORI, T. Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. **Autophagy**, v. 3, n. 5, p. 452–460, 20 set. 2007.

KLIONSKY, D. J. et al. **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) 1**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.tandfonline.com/journals/kaup20>.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 10 jan. 2009.

KUSMA, J. et al. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11–12, p. 1722–1736, nov. 2008.

LAU, A. et al. Arsenic Inhibits Autophagic Flux, Activating the Nrf2-Keap1 Pathway in a p62-Dependent Manner. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 12, p. 2436–2446, 1 jun. 2013.

LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochemical Journal**, v. 391, n. 2, p. 317–323, 15 out. 2005.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 10, p. 790–802, out. 2003.

LINGWOOD, D. et al. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 5, p. 955–960, 1 out. 2009.

LOPES, P. H. et al. Targeting *Loxosceles* spider Sphingomyelinase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for loxoscelism. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 310–321, 1 jan. 2019.

LOPES, P. H.; BERG, C. W. VAN DEN; TAMBOURGI, D. V. Sphingomyelinases D From *Loxosceles* Spider Venoms and Cell Membranes: Action on Lipid Rafts and Activation of Endogenous Metalloproteinases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 13 maio 2020.

MACEYKA, M.; SPIEGEL, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 58–67, 5 jun. 2014.

MAHAPATRA, K. K. et al. The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 23, p. 7435–7449, 30 dez. 2021.

MALAUQUE, C. M. S. et al. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664–671, dez. 2011.

MALAUQUE, C. M. S. et al. *Loxosceles* and Loxoscelism: Biology, Venom, Envenomation and Treatment. Em: **Spider Venoms**. [s.l.] Springer Netherlands, 2015. p. 1–22.

MARTIN, S. J. et al. Inhibition of ceramide-induced apoptosis by Bcl-2. **Cell death and differentiation**, v. 2, n. 4, p. 253–7, out. 1995.

MEDINA-SANTOS, R. et al. Analysis of NGS data from Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom gland reveals toxin diversity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 43, p. 101017, set. 2022.

MOOLENAAR, W. H.; VAN MEETEREN, L. A.; GIEPMANS, B. N. G. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. **BioEssays**, v. 26, n. 8, p. 870–881, 19 ago. 2004.

MORGON, A. M.; CHAIM, O. M. **CITOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO: A ATIVIDADE DA TOXINA DERMONECRÓTICA DO VENENO DE ARANHA-MARROM SOBRE MEMBRANAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS *IN VITRO***. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/handle/1884/48184>>. Acesso em: 6 jun. 2024.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MURAKAMI, M. T. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester

phosphodiesterases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 1, p. 323–329, mar. 2006.

MURPH, M. et al. Of Spiders and Crabs: The Emergence of Lysophospholipids and Their Metabolic Pathways as Targets for Therapy in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 22, p. 6598–6602, 15 nov. 2006.

NAKAMURA, Y. et al. A Novel Phosphatidylcholine-hydrolyzing Phospholipase C Induced by Phosphate Starvation in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7469–7476, mar. 2005.

NGUYEN, N.; PANDEY, M. Loxoscelism: Cutaneous and Hematologic Manifestations. **Advances in Hematology**, v. 2019, p. 1–6, 20 mar. 2019.

NORAMBUENA, A.; SCHWARTZ, M. A. Effects of integrin-mediated cell adhesion on plasma membrane lipid raft components and signaling. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 18, p. 3456–3464, 15 set. 2011.

NOWATZKI, J. et al. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 535–543, set. 2010.

NOWATZKI, J. et al. Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 396–405, set. 2012.

OSPEDAL, K. Z. et al. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, n. 6, p. 287–294, 25 dez. 2002.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in HaCaT Keratinocytes Apoptosis Induced by *Loxosceles* Venom Sphingomyelinase D. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 61–68, jan. 2006.

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

PLATNICK, N. I.; RAVEN, R. J. Spider Systematics: Past and Future. **Zootaxa**, v. 3683, n. 5, 8 jul. 2013.

PONEC, M. et al. Characterization of Reconstructed Skin Models. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 15, n. Suppl. 1, p. 4–17, 2002.

QIANG, L. et al. Keratinocyte autophagy enables the activation of keratinocytes and fibroblasts and facilitates wound healing. **Autophagy**, v. 17, n. 9, p. 2128–2143, 2 set. 2021.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 12 jul. 2008.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. [s.l: s.n.].

RIVERA, I.-G. et al. Sphingomyelinase D/Ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammation. **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1457–1466, 29 abr. 2015.

ROJAS, J. et al. Phospholipase D from *Loxosceles laeta* Spider Venom Induces IL-6, IL-8, CXCL1/GRO- α , and CCL2/MCP-1 Production in Human Skin Fibroblasts and Stimulates Monocytes Migration. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 125, 5 abr. 2017.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia - Texto e Atlas. Em: **Histologia - Texto e Atlas**. 6. ed. [s.l: s.n.].

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012.

SCHURER, N. Y.; ELIAS, P. M. The Biochemistry and Function of Stratum Corneum Lipids. Em: [s.l: s.n.]. p. 27–56.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569–572, 5 jun. 1997.

SINAN. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <<https://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 9 jun. 2024.

STOCK, R. P. et al. Sphingomyelinase D Activity in Model Membranes: Structural Effects of in situ Generation of Ceramide-1-Phosphate. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e36003, 25 abr. 2012.

STODDARD, N. C.; CHUN, J. Promising Pharmacological Directions in the World of Lysophosphatidic Acid Signaling. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 1–11, 31 jan. 2015.

STRAUS, A. H. et al. Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis*. Immunogenicity and role in parasite binding and invasion of macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13723–30, 25 jun. 1993.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, n. 1, 15 mar. 1997.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 213–221, maio 2006.

TAVARES, F. L. et al. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1567–1574, 19 out. 2011.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, set. 1979.

TREVISAN-SILVA, D. et al. A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom. **Scientific Data**, v. 4, n. 1, p. 170090, 11 jul. 2017.

VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 1998.

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

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, jul. 1995.

VETTER, R. S.; ISBISTER, G. K. Medical Aspects of Spider Bites. **Annual Review of Entomology**, v. 53, n. 1, p. 409–429, 1 jan. 2008.

VUITIKA, L. et al. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 11, p. 2479–2492, nov. 2013.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Drug Information**. [s.l: s.n.].

WORLD SPIDER CATALOG. **World Spider Catalog** Natural History Museum Bern, , 2024. (Nota técnica).

YIN, Z. et al. Cell-sensitive phase contrast microscopy imaging by multiple exposures. **Medical Image Analysis**, v. 25, n. 1, p. 111–121, out. 2015.

YUNG, Y. C.; STODDARD, N. C.; CHUN, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 7, p. 1192–1214, jul. 2014.

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

ZERNIKE, F. How I Discovered Phase Contrast. **Science**, v. 121, n. 3141, p. 345–349, 11 mar. 1955.

ZHAO, C. et al. Lysophosphatidic acid-induced IL-8 secretion involves MSK1 and MSK2 mediated activation of CREB1 in human fibroblast-like synoviocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 90, n. 1, p. 62–72, jul. 2014.

ZHENG, X.; BOLLINGER BOLLAG, W. Aquaporin 3 Colocates with Phospholipase D2 in Caveolin-Rich Membrane Microdomains and Is Downregulated Upon Keratinocyte Differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 6, p. 1487–1495, dez. 2003.

ZHOU, C. et al. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. **Autophagy**, v. 8, n. 8, p. 1215–1226, 31 ago. 2012.

ANEXO I - DESCRIÇÃO ESTATÍSTICA

Esta seção apresenta os resultados com significâncias estatísticas de todos os gráficos evidenciados neste trabalho. Gráficos que não são mencionados em suas respectivas seções ou nesta seção, não apresentaram resultados estatisticamente significativos. As tabelas a seguir resumem as comparações entre diferentes grupos e condições experimentais, focando nos efeitos dos fatores de tempo e tratamento.

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) bidirecional emparelhada, seguida do teste *post hoc* de Tuckey. A análise estatística foi efetuada utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 10.2.3, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Significância definida conforme as legendas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Tabela 2. Análise de variância das comparações temporais e de tratamento dos níveis de ATP liberados pelos queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes nos tempos 0 hora, 1 hora, 4 horas, 8 horas e 24 horas.

Condição	Comparação	<i>P value</i>	Significância
Controle	0 hora vs. 1 hora	0,0224	*
	1 hora vs. 4 horas	0,0130	*
	4 horas vs. 8 horas	0,0112	*
	4 horas vs. 24 horas	0,0351	*
Veneno	0 hora vs. 1 hora	0,0349	*
	0 hora vs. 4 horas	0,0040	**
	0 hora vs. 8 horas	0,0278	*
	1 hora vs. 4 horas	0,0068	**
	1 hora vs. 8 horas	0,0199	*
LiRecDT1	0 hora vs. 1 hora	0,0255	*
	0 hora vs. 4 horas	0,0042	**
	0 hora vs. 8 horas	0,0133	*
	0 hora vs. 24 horas	0,0198	*
	1 hora vs. 4 horas	0,0089	**
	1 hora vs. 8 horas	0,0138	*
	4 horas vs. 24 horas	0,0021	**

	8 horas vs. 24 horas	0,0072	**
LiRecDT1 H12A	0 hora vs. 4 horas	0,0149	*
	0 hora vs. 8 horas	0,0034	**
	1 hora vs. 4 horas	0,0391	*
	1 hora vs. 8 horas	0,0094	**
	8 horas vs. 24 horas	0,0340	*

Legenda: Análise de variância de duas vias com medidas repetidas (Two-way RM ANOVA) dos níveis de ATP liberados por queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* (5 µg/ml) e toxinas recombinantes (5 µg/ml) em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 4, 8 e 24 horas). A tabela apresenta a variação percentual total explicada pelos fatores analisados, os valores de P, e a correção de Geisser-Greenhouse aplicada devido à não assunção de esfericidade. Resultados indicam significância estatística para os fatores de linha (tempos de incubação) e para a interação entre fatores de linha e coluna, enquanto o fator de coluna isoladamente não apresentou significância.

Tabela 3. Análise de variância das comparações temporais e de tratamento dos níveis de ATP liberados pelos queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes nos tempos 0 hora, 1 hora, 4 hora, 8 hora e 24 horas.

Condição	Comparação	P value	Significância
Controle	0 hora vs. 1 hora	0,0224	*
	1 hora vs. 4 horas	0,0130	*
	4 horas vs. 8 horas	0,0112	*
	4 horas vs. 24 horas	0,0351	*
Veneno	0 hora vs. 1 hora	0,0087	**
	1 hora vs. 4 horas	0,0103	*
	1 hora vs. 8 horas	0,0271	*
	1 hora vs. 24 horas	0,0487	*
LiRecDT1	0 hora vs. 4 horas	0,0034	**
	0 hora vs. 8 horas	0,0133	*
	1 hora vs. 4 horas	0,0420	*
	4 horas vs. 24 horas	0,0234	*
LiRecDT1 H12A	0 hora vs. 4 horas	0,0093	**
	0 hora vs. 8 horas	0,0017	**
	1 hora vs. 4 horas	0,0300	*
	1 hora vs. 8 horas	0,0054	**
	4 horas vs. 8 horas	0,0005	***

0 hora	4 horas vs. 24 horas	0,0202	*
	8 horas vs. 24 horas	0,0041	**
	Controle vs. LiRecDT1	<0,0001	****
	Controle vs. LiRecDT1 H12A	0,0003	***
	Veneno vs. LiRecDT1	<0,0001	****
	Veneno vs. LiRecDT1 H12A	0,0002	***

Legenda: Análise de variância de duas vias com medidas repetidas (Two-way RM ANOVA) dos níveis de ATP liberados por queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* (10 µg/ml) e toxinas recombinantes (10 µg/ml) em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 4, 8 e 24 horas). A análise inclui os fatores de linha (tempos de incubação) e de coluna (tratamentos), considerando a não esfericidade dos dados e aplicando a correção de Geisser-Greenhouse. Os resultados mostram significância para os fatores de linha e para a interação entre os fatores de linha e coluna, enquanto o fator de coluna isoladamente não apresentou significância. O valor de alfa foi estabelecido em 0,05.

Tabela 4. Análise de variância das comparações temporais e de tratamento dos níveis de vermelho neutro internalizado por queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, nos tempos 0 hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas e 24 horas.

Condição	Comparação	P value	Significância
Veneno	1 hora vs. 4 horas	0,0377	*
6 horas	Veneno vs. LiRecDT1 H12A	0,0389	*

Legenda: Análise de variância de efeitos mistos (Mixed-effects model, REML) dos níveis de vermelho neutro internalizado por queratinócitos humanos após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* (25 µg/ml) e toxinas recombinantes (25 µg/ml) em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas). A análise inclui os fatores de linha (tempos de incubação) e de coluna (tratamentos), considerando a não esfericidade dos dados. Os efeitos fixos incluem os fatores de linha, coluna, e sua interação, enquanto os efeitos aleatórios incluem as variações entre sujeitos e residual. A correspondência dos dados foi eficaz, conforme indicado pelo teste de Chi-quadrado. O valor de alfa foi estabelecido em 0,05.

Tabela 5. Análise de variância das comparações temporais e de tratamento da atividade da desidrogenase mitocondrial na linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes nos tempos de 0 hora, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas.

Condição	Comparação	P value	Significância
Veneno	0 hora vs. 16 horas	0,0008	***
LiRecDT1	0 hora vs. 16 horas	0,0002	***
LiRecDT1 H12A	0 hora vs. 16 horas	0,0010	**
16 horas	Controle vs. Veneno	0,0031	**
	Veneno vs. LiRecDT1	0,0066	**
	Veneno vs. LiRecDT1 H12A	0,0039	**

Legenda: Análise de variância de efeitos mistos (Mixed-effects model, REML) da atividade da desidrogenase mitocondrial em queratinócitos humanos (HaCaT) após incubação com veneno total de

Loxosceles intermedia (25 µg/ml) e toxinas recombinantes (25 µg/ml) em diferentes tempos (0, 1, 2, 6, 16 e 24 horas). A tabela apresenta os efeitos fixos (fatores de linha e coluna, e sua interação) e os efeitos aleatórios (variação entre sujeitos e residual). A correção de Geisser-Greenhouse foi aplicada devido à não esfericidade dos dados. Os valores de P e os resumos de significância indicam que houve diferenças estatisticamente significativas para o fator de linha, mas não para o fator de coluna ou sua interação.

Tabela 6. Análise de variância das comparações temporais e de tratamento da atividade da desidrogenase mitocondrial na linhagem de fibroblastos humanos (HFF-1) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* e toxinas recombinantes, nos tempos de 0 hora, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas.

Condição	Comparação	P value	Significância
Controle	1 hora vs. 16 horas	0,0118	*
LiRecDT1	1 hora vs. 16 horas	0,0017	**
	6 horas vs. 16 horas	0,0499	*
1 hora	Veneno vs. LiRecDT1 H12A	0,0070	**
6 horas	Controle vs. Veneno	0,0439	*
	Veneno vs. LiRecDT1 H12A	0,0403	*

Legenda: Análise de variância de medidas repetidas (Two-way RM ANOVA) da atividade da desidrogenase mitocondrial em fibroblastos humanos (HFF-1) após incubação com veneno total de *Loxosceles intermedia* (25 µg/ml) e toxinas recombinantes (25 µg/ml) em diferentes tempos (0, 1, 2, 6, 16 e 24 horas). A tabela apresenta as fontes de variação (fatores de linha e coluna e sua interação), a percentagem de variação total explicada, os valores de P, resumos de significância, e o coeficiente de esfericidade de Geisser-Greenhouse.

Tabela 7. Análise de variância das comparações temporais e de tratamento da análise de morte celular na linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* 25 µg/ml e toxinas recombinantes 25 µg/ml, indicando marcação com Anexina-V e 7-AAD, nos tempos de 1 hora, 4 horas, 6 horas, 16 horas e 24 horas.

Condição	Comparação	P value	Significância
LiRecDT1	6 horas vs. 24 horas	0,0259	*
	16 horas vs. 24 horas	0,0469	*
6 horas	Controle vs. LiRecDT1	0,0246	*
	LiRecDT1 vs. LiRecDT1 H12A	0,0282	*
16 horas	Controle vs. LiRecDT1	0,0402	*
	LiRecDT1 vs. LiRecDT1 H12A	0,0167	*
24 horas	Controle vs. LiRecDT1	0,0144	*
	Controle vs. LiRecDT1 H12A	0,0461	*

Legenda: Análise de variância de modelo misto (REML) da morte celular em queratinócitos humanos (HaCaT) induzida pelo veneno total de *Loxosceles intermedia* (25 µg/ml) e toxinas recombinantes (25 µg/ml). As células foram analisadas para dupla marcação com Anexina-V e 7-AAD nos tempos de 1, 4, 6, 16 e 24 horas. A tabela apresenta os efeitos fixos e aleatórios, incluindo os fatores de linha e coluna, sua interação, variação total explicada, valores de P, e o resumo de significância estatística.

ANEXO II - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

Resumo aprovado para apresentação de pôster na Conferência de Autofagia de Buenos Aires 2017: “Buenos Aires Research Conferences on Autophagy - Molecular Mechanisms in Biology and Disease”

Insights on the in vitro cytotoxicity of Brown spider Phospholipase-D toxin

Introduction: Envenomation by Brown spiders (*Loxosceles* genus) is a public health problem. Their venom contains peptides and proteins toxins essentially, which as bioactive molecules act synergistically. Phospholipases-D (PLDs) are very active, hydrolyze cell membrane phospholipids and reproduce, by itself, most of the venom toxic effects, such as dermonecrosis, inflammatory responses, vascular permeability, hemolysis, and renal failure. 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. **Objective:** This work aims to comprehend the molecular mechanisms and cellular responses 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. **Methods:** Recombinant PLDs toxins LiRecDT1 and LiRecDT1/H12A were expressed in an *E.coli* strain and then evaluated in relation to their sphingomyelinase activity. The interaction of LiRecDT1 with the plasma membrane of the endothelial cells were evaluated by phase contrast, and confocal fluorescence microscopy. Endothelial cell viability and cytotoxicity were assessed by in vitro assays, as well as morphology by confocal microscopy. **Results:** It was shown that the venom promotes rabbit aorta endothelial cell (RAEC) detachment and that LiRecDT1 induces cell vacuolization and cell morphology alteration after few hours incubation with the toxin, event still observed after 24hours. It was also previewed the interaction of LiRecDT1/GFP with the plasma membrane, specifically with membrane microdomains characterized by lipid rafts, besides the targeting for vesicles of the endosome/lysosome system, events occurring in a time dependent manner, was determined. Regarding the triggering of the autophagic process, it was possible to verify a difference in the behavior of endothelial cells, since the venom reached the final stage of autophagy with the formation of autolysosome. The cells submitted to treatment with LiRecDT1 presented autophagic induction, with a smaller amount of lysosomal aggregates compared to the venom, but when compared to the treatment with the mutated phospholipase, it presents a smaller amount of lysosomal aggregates, even with smaller sizes. **Conclusion:** PLD toxin depends on its activity to be cytotoxic and internalization is seen. These findings lead to instigate: Is it the PLD final destiny? Is it restricted to membrane retrograde route? Are its effects related to autophagic mechanisms?

Premiação com o "Travel Award" pela ICGEB Travel award - BA Conference Autophagy, o que possibilitou minha participação no "Buenos Aires Research Conferences on Autophagy - Molecular Mechanisms in Biology and Disease"

02/07/2024, 21:11

Gmail - Buenos Aires Research Conferences on Autophagy 2017



Vanessa Ribeiro <vanebiomed@gmail.com>

Buenos Aires Research Conferences on Autophagy 2017

Daniel Grasso <dgrasso@ffyb.uba.ar>

29 de agosto de 2017 às 13:48

Para: silviahellfire@gmail.com, wkerllenmartins@gmail.com, vane.biomed@gmail.com, carolinepsantos@yahoo.com.br, thabatadue@gmail.com, jimenabravoortega@gmail.com, oscar_hidalgo@javeriana.edu.co

Dear researcher,

We are pleasure to inform that you have been selected for ICGEB travel award to participate in the "Buenos Aires Research Conferences on Autophagy 2017".

At the moment, we can ensure to the inscription fee of 300 Euros plus the equivalent in argentinean pesos of USD 200.

To complete your final acceptance to the award, we request that send to us an abstract in order to participate in the "poster session" in which results, research lines or projects could be presented.

Those Fellows that require a visa application, please contact us in case to need some documentation such as invitation letter or others.

In order to manage our organization, we kindly request confirm your attendance to the meeting before September the 1st.

Kind regards.

Buenos Aires Research Conferences Scientific Committee

--

Dr. Daniel H. Grasso

Investigador Asistente, CIC-CONICET
Jefe de Trabajos Prácticos de Fisiopatología, UBA

Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Junin 956 p5 (C1113AAD) - CABA, Argentina
+5411 5287 4518 ; dgrasso@ffyb.uba.ar



**Poster apresentado na Conferência de Autofagia de Buenos Aires 2017:
“Buenos Aires Research Conferences on Autophagy - Molecular Mechanisms in
Biology and Disease”**

INSIGHTS ON THE IN VITRO CYTOTOXICITY OF BROWN SPIDER PHOSPHOLIPASE-D

Vanessa Ribeiro-Heidemmann¹; Adriano M. Morgon¹, Paula Deboni^{1,2}, Gustavo Viana², Marcelo A. Lima², Silvio S. Veiga¹, Olga M. Chaim¹

¹Department of Cell Biology, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.

²Department of Biochemistry, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil

e-mail: vane.biomed@gmail.com, vanessaribeiro@ufpr.br



Travel Award

Abstract

Envenomation by Brown spiders (*Loxosceles* genus) is a public health problem. Their venom contains peptides and proteins toxins essentially, which as bioactive molecules act synergistically. Phospholipases-D (PLDs) are very active, hydrolyze cell membrane phospholipids and reproduce, by itself, most of the venom toxic effects, such as dermonecrosis, inflammatory responses, vascular permeability, hemolysis, and renal failure. The toxin LiReDcT1, 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. This work aims to comprehend the molecular mechanisms and cellular responses of action of the venom and LiReDcT1 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. Recombinant PLDs toxins LiReDcT1 and LiReDcT1/H12A were expressed in an *E. coli* strain and then evaluated in relation to their sphingomyelinase activity. The interaction of LiReDcT1 with the plasma membrane of the endothelial cells were evaluated by phase contrast, and confocal fluorescence microscopy. Endothelial cell viability and cytotoxicity were assessed by in vitro assays, as well as morphology by confocal microscopy.

Recombinant PLDs expression, purification, and enzyme activity upon sphingomyelin

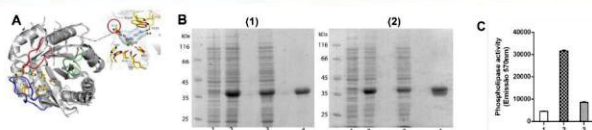


Figure 1. (A) Molecular structure of phospholipase-D showing the mutagenic site at histidine 126. (B) SDS-PAGE analysis of protein expression and purification of LrRCeDTP1 and its mutant LrRCeDTP1 H12A/D. Proteins were stained by Coomassie blue dye. Lane 1: E. coli BL21(DE3) pLysE cells collected before induction with 0.05 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG); lane 2: E. coli centrifugation after 3.5 h of induction with IPTG; lane 3: supernatants of cells lysated by mechanical lysis in non-denaturing extraction buffer; lane 4: purified toxins by Ni-NTA affinity chromatography. (C) Enzyme activity assay of purified recombinant phospholipases-D. Indirect detection method of Amplex® Red choline reagent for 60 min at 37 °C. (D) Gelatin active region of purified recombinant phospholipases-D. LrRCeDTP1 10 μg (S), LrRCeDTP1 H12A 10 μg (M). The fluorescence of the substrate hydrolysis product was detected at 580 nm.

Morphological changes in endothelial cells induced by the recombinant PLD toxins and whole venom of Brown spider

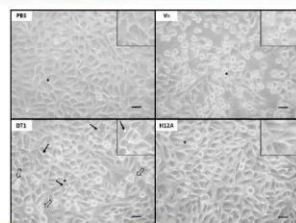
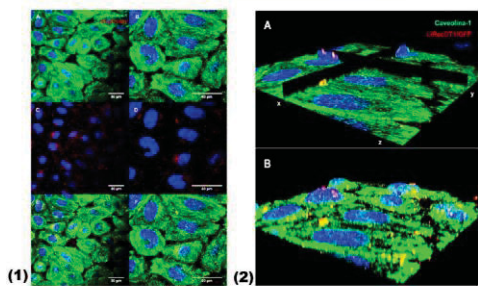


Figure 2. Rabbit aorta endothelial cell line (RAEC) exposed to PBS, venom of *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1, and LiRecDT1 H12A observed after 6 hours of incubation.

Differences in morphological changes were not seen between cells exposed to LiRecDT1 H12A and PBS, however, cells exposed to LiRecDT1 showed cytoplasmic vacuolization (filled arrows) and rounded shape (empty arrows). RAEC exposed to the whole venom shows to be rounded which indicates detachment of the extracellular matrix. Asterisks represent an enlarged area in the inserts. Bars represent 50µm. Magnification 20x and digital amplification of 2.6x (final images at 520x).

Binding of PLD-GFP onto caveolin-1-containing lipid rafts of endothelial cells



after after 4 hours of exposure to the toxin. (B) Three-dimensional representation of the orthogonal projection evidencing the region of toxin interaction with the cells visualized through cell volume projection.

Super-resolution and TIRF microscopy for details of PLD-GFP binding on the lipid rafts

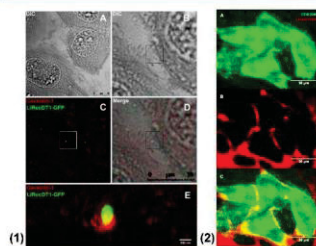


Figure 4. RAEc co-exposed to LiRcDcT1-GFP after 4 hours (50 µg/ml). **(I)** Super-resolution fluorescence microscopy analysis; differential interference contrast technique DIC (**A** 830x, **B** 910x) [*i*]; Caveolin-1 in red and LiRcDcT1-GFP in green-labeling (**C,D** 910x; and **E** 1600x); Merge **B** plus **C** depicts protein localization on the plasma membrane, overlapping in orange shows co-exposure (**D**); amplification of the structure observed in the squared area in **C** and **D** which suggests the formation of caveolae with the toxin (**E**). **(2)** Green **C**2b toxin conjugated to the GM1 ganglioside represents lipid rafts on the plasma membrane (**A**) and LiRcDcT1-GFP in red. Yellow/orange revealed protein overlapping on the membrane, which strengthened the idea of toxin binding to the lipid rafts. Merge **A,B** magnification1065x (**C**)

Internalization of PLD-GFP into the Endosome/Lysosome system by endothelial cells

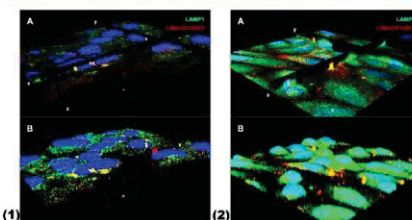


Figure 5. The LAMP1 and LAMP2 proteins represent vesicles of the endosome/lysosome system, observed by the green marking. LiRcDT1/GFP was observed by red labeling. (A) Orthogonal projection of the RAEC cells exposed to LiRcDT1/GFP after 4 hours of exposure (50 µg/ml), showing the toxin interaction visualized by projection of the x, y and z axes. (B) Three-dimensional representation of the orthogonal projection evidencing the toxin interaction site with the cells visualized through cell volume projection. The co-localization of the toxin with LAMP1 or LAMP2 indicate endosome/lysosome system pattern visualized by the yellow/orange color.

Formation of autolysosome induced by Brown spider venom and recombinant toxins in endothelial cells: Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3 in Live Microscopy

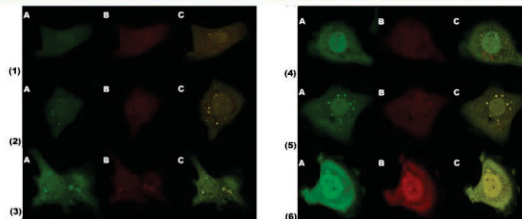


Figure 5. Monitoring autophagy flux in autophagy-lendomegosome RFP-GLC3. RAE6 were visualized after 4 to 8 hours incubation to (1) HBSS buffer with autophagy positive control (Hanta Balanced Salt Solution), (2) Chloroquine for inhibition of autophagy (150 μ M), (3) Untreated negative control (F12 medium + 10% FBS), (4) Whole venom (Vn) (50 μ g/mL), (5) LReaD21 (50 μ g/mL) and (6) LReaD21 H2A 50 μ g/mL. A Green fluorescence levels relative to the GFP tag, while (B) to the monomeric red fluorescent protein (mRFP) and (C) Merge channels. (1, 2 and 3) HBSS showed autophagy induction, chloroquine blocked the expected pattern of autophagy and no autophagy signs were observed in the untreated cells as expected, respectively. RAE6 showed the final stage of autophagy with the formation of autolysosome after venom and recombinant toxins exposure. At smaller amount of lysosomal aggregates were formed in PLDs-induced cells compared to the venom. However, the treatment with the mutated LReaD21 (LReaD21 H2A) did not induce autophagy in RAE6 cells. (4) Whole venom, (5) LReaD21 and (6) LReaD21 H2A induced autophagy in RAE6 cells. Endothelial cells submitted to the treatment with LReaD21 presented autophagy response which suggests to be dependent to its enzymatic activity.

Conclusion

Microscopy findings shown herein that the whole venom and recombinant toxins isoforms promote changes in the endothelial cells observed, detachment, and vacuolization in a concentration- and time- dependent manner, which increases when spreading until 24 hours. It was observed the interaction of LiReCDT1-GFP onto the plasma membrane, specifically with caveolins and Gelsolin microfilaments. In the same way, results suggested endocytosis of the toxin via caveolae pathway, triggering the activation of the endomembranous system. PLD toxin depends on its own cytoskeleton to be cytotoxic, as well as its internalization. Additionally, autophagic process was possible to be verified by live microscopy. Differences in the behavior of endothelial cells were detected since the venom induced the final stage of autophagy with the formation of autolysosomes. Meanwhile, endothelial cells submitted to the active toxin presented autophagic induction, but with a smaller amount of lysosomal aggregates compared to the whole venom. Interestingly, the treatment with the mutated phospholipase presented a smaller amount and size of lysosomal aggregates. These results lead to more questions: Is it the PLD final destiny? Is it restricted to membrane retrograde route? Are its effects related to autophagic mechanisms?

Supported by **CNPq** **FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA** **FAPESP**

ANEXO III - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

Resumo aprovado para o XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2018.

Insights on the in vitro cytotoxicity of Brown spider Phospholipase-D toxin

Introduction: The venom of spiders of *Loxosceles* genus contains peptides and proteins toxins which act synergistically. Phospholipases D (PLD), hydrolyze cell membrane phospholipids and reproduce, by itself, most of the venom toxic effects, such as dermonecrosis, inflammatory responses, vascular permeability, hemolysis, and renal failure. The recombinant toxin LiRecDT1 from *L. intermedia*, recruit neutrophils in rabbit skin, binds rabbit aorta endothelial cells (RAEC) membrane, induce lipid raft reorganization, however, some mechanisms remain unknown. **Aims:** This work aims to comprehend the cellular mechanisms and responses of the venom and LiRecDT1 over RAECs, determining the cell alterations and destination of the toxin. **Methods:** Recombinant PLD toxins LiRecDT1 and LiRecDT1/H12A were expressed and proved their activity. RAEC's ratings, like interaction with LiRecDT1 and morphology analysis, were evaluated by phase contrast and confocal fluorescence microscopy. **Results:** It was shown that, in a time-dependent manner, RAEC incubation with venom promotes cell detachment and with LiRecDT1 induces cell vacuolization and morphology alteration. It was also previewed the interaction of LiRecDT1/GFP with the plasma membrane, within lipid rafts, possibly targeting for vesicles of the endosome/lysosome system. Regarding the autophagic process, it was possible to verify a difference in the behavior of RAEC, since the venom reached the final stage of autophagy with the formation of autolysosome. The treatment with LiRecDT1 and LiRecDT1/H12A presented block, with differences between a smaller amount and sizes of lysosomal aggregates. **Conclusion:** We know now that PLD toxin depends on its activity to be cytotoxic and be internalized, that lysosome is one of your destination and the activation of autophagic mechanisms are different.

Poster I apresentado no XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2018.



INSIGHTS ON THE IN VITRO CYTOTOXICITY OF BROWN SPIDER PHOSPHOLIPASE-D

Vanessa Ribeiro Heidemann⁽¹⁾, Adriano Marcelo Morgon⁽¹⁾, Paula Deboni^(1,2), Renan Pelluzzi Cavalheiro⁽²⁾, Gustavo Monteiro Viana⁽²⁾, Marcelo Andrade de Lima⁽²⁾, Helena B. Nader⁽²⁾, Andrea Senff-Ribeiro⁽¹⁾, Luiza Gremiski⁽¹⁾, Sílvia Sanches Veiga⁽¹⁾, Olga Meiri Chaim⁽¹⁾.

¹Department of Cell Biology, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.
²Department of Biochemistry, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil

vane.biomed@gmail.com – (41) 3361-1681
Laboratory of extracellular matrix and biotechnology of venoms - 195

Abstract

Introduction: The venom of *Loxosceles* spiders is a mixture of peptides and proteins, which act synergistically. Phospholipases-D toxins (PLD) hydrolyze membrane phospholipids and reproduce, by itself, most of the venom toxicity, such as dermonecrosis, inflammatory responses, hemolysis, and nephrotoxicity. The recombinant PLD from *L. intermedia* (LiRecDT1) recruits neutrophils into the dermis and binds onto endothelial cells (RAEC) membrane inducing reorganization of GM1-enriched lipid microdomains. Still, PLD molecular mechanisms remain entirely unknown. **Aims:** To comprehend the cellular alterations triggered by the whole venom and LiRecDT1 upon RAECs. To identify the intracellular destination of the toxins *in vitro*. **Methods:** PLD toxin isoforms LiRecDT1 and LiRecDT1/H12A were expressed heterologously and tested for their enzyme activity. The interaction of toxins with RAEC and their morphological changes were evaluated by phase contrast and confocal fluorescence microscopy.

Recombinant PLDs expression, purification, and enzyme activity upon sphingomyelin

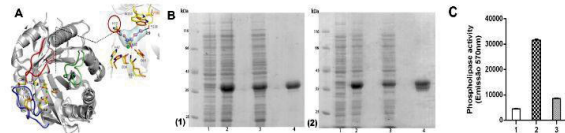


Figure 1. (A) Molecular structure of phospholipase-D showing the mutagenesis site at histidine 12. (B) SDS-PAGE analysis of protein expression and purification of LiRecDT1 (1) and its mutant LiRecDT1 H12A (2). Proteins were stained by Coomassie blue dye. Lane 1: E. coli BL21 (DE3) pLysS cells collected before induction with 0.05 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG); lane 2: E. coli centrifugation after 3.5 h of induction with IPTG; lane 3: supernatants of cell lysates obtained by mechanical lysis in non-denaturing extraction buffer; lane 4: purified toxins by Ni-NTA affinity chromatography. (C) Enzyme activity assay of purified recombinant phospholipases-D. Indirect detection method of Amplex® Red choline release for 60 minutes at 37°C. (1) PBS as negative reaction control in the absence of any toxins. (2) LiRecDT1 10µg (3) LiRecDT1 H12A 10µg. The fluorescence of the reaction was determined by spectrofluorimetry with excitation at 560 nm and at 590 nm.

Morphological changes in endothelial cells induced by the recombinant PLD toxins and whole venom of Brown spider

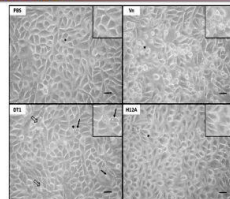


Figure 2. Rabbit aorta endothelial cell line (RAEC) exposed to PBS, venom of *L. intermedia* (Vn), LiRecDT1, and LiRecDT1 H12A observed after 6 hours of incubation. Differences in morphological changes were not seen between cells exposed to LiRecDT1 H12A and PBS, however, cells exposed to LiRecDT1 showed cytoplasmic vacuolization (filled arrows) and rounded shape (empty arrows). RAEC exposed to the whole venom shows to be rounded which indicates detachment of the extracellular matrix. Asterisks represent an enlarged area in the inserts. Bars represent 50µm. Magnification 20x and digital amplification of 2.6x (final images at 520x).

Analysis of cell metabolic activity in endothelial cells caused by recombinant toxins and venom of *Loxosceles intermedia* observed by MTT

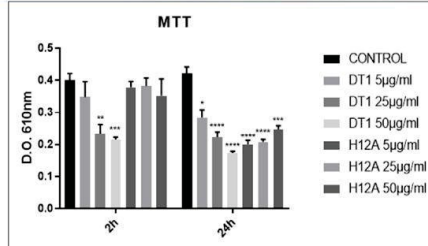


Figure 3. Cell viability analysis according MTT method for cytotoxicity. RAECs were exposed to the LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A (5µg/mL, 25µg/mL and 50µg/mL) after 2 or 24 hours, and the cytotoxic effects caused by LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A were assessed. After 2 hours of incubation, total dehydrogenase activity was reduced by both LiRecDT1 at 25µg/mL and 50µg/mL, in a concentration-dependent manner. Although at 24 hours, all conditions showed a reduction in cell viability and mitochondrial metabolic activity. The experiment (n=2) was performed in pentaplicates and OD_{570nm} values represent the averages ± SEM. (** P = 0.0012 e *** P < 0.0001).

Binding of PLD-GFP onto caveolin-1-containing lipid rafts of endothelial cells

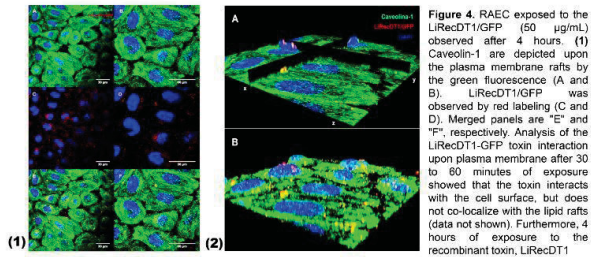
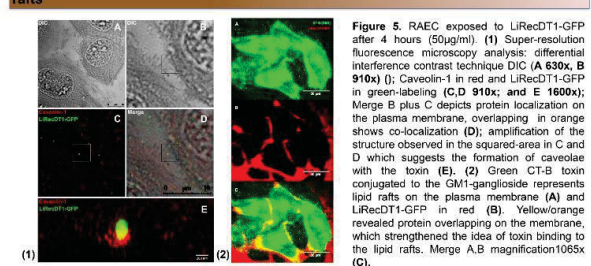
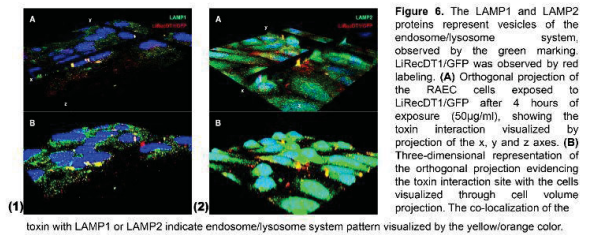


Figure 4. RAEC exposed to the LiRecDT1-GFP (50 µg/mL) observed after 4 hours. (1) Caveolin-1 are depicted upon the plasma membrane rafts by the green fluorescence (A and B). LiRecDT1-GFP was observed by red labeling (C and D). Merged panels are "E" and "F", respectively. Analysis of the LiRecDT1-GFP toxin interaction upon plasma membrane after 30 to 60 minutes of exposure showed that the toxin interacts with the cell surface, but does not co-localize with the lipid rafts (data not shown). Furthermore, 4 hours of exposure to the recombinant toxin, LiRecDT1 interacts with the caveolin-1-containing sites on the plasma membrane. Co-localization of both proteins is visualized by the yellow/orange fluorescence pointed by the arrows. Increase of 630x (A, C, and E) and 1065x (B, D, and F). (2) Orthogonal projection and 3-D visualization. (A) Orthogonal view of RAEC exposed to LiRecDT1-GFP (50 µg/mL) through the projection of the x, y and z axes, observed after 4 hours of exposure to the toxin. (B) Three-dimensional representation of the orthogonal projection evidencing the region of toxin interaction with the cells visualized through cell volume projection.

Super-resolution and TIRF microscopy for details of PLD-GFP binding on the lipid rafts



Internalization of PLD-GFP into the Endosome/Lysosome system by endothelial cells



Conclusion

Microscopy findings showed herein that the whole venom and recombinant toxins isoforms promote changes in the endothelial cells spreading, detachment, and vacuolization. Furthermore, cytotoxicity follows the morphological changes mainly for the active toxin, in a concentration- and time-dependent manner, which increases significantly at 24 hours. It was observed the interaction of LiRecDT1-GFP onto the plasma membrane, specifically with caveolin-1 and GM-1-microdomains. In the same way, results suggested endocytosis of toxin by caveolae-pathway, targeting vesicles of the endosome/lysosome system. PLD toxin depends on its enzyme activity to be cytotoxic as well as its internalization. These results lead to more questions: Is it the PLD final destiny? Is it restricted to membrane retrograde route? Are its effects related to autophagic mechanisms? PLD depends on its activity to be cytotoxic and internalized, driven by lysosomes as an intracellular destination. Interestingly, an impaired autophagic process requires to be further explored for its role in the venom toxicity.

References

- CHAIM, O. M. et al. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim Biophys Acta*, v. 1811, p. 84-96, 2011a.
- CHAIM, O. M. et al. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venoms' Toxins' Tools for Biological Purposes. *Toxins (Basel)*, v. 3, p. 309-344, 2011b.
- FUTRELL, J. M. Loxoscelism. *Am J Med Sci*, v. 304, p. 251-267, 1992.
- GREIFER, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biocyst.*, v. 6, p. 2403-2416, 2010.
- LEE, S. e LYNN, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J*, v. 391, p. 317-323, 2005.
- MUNRO, S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, v. 115, p. 377-388, 2003.
- RIVERA, I. G. et al. Sphingomyelinase D (serine-1 phosphatase) in cell survival and inflammation. *Toxins (Basel)*, v. 7, p. 1451-1466, 2015.

Supported by

ANEXO IV - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

Resumo aprovado para o XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2018.

Cellular aspects of the toxicity of the Brown spider venom and recombinant phospholipase-D toxin in keratinocytes and fibroblasts in vitro.

Introduction: Brown spiders venom (*Loxosceles* genus) has been reported to be essentially a mixture of peptides and enzymes with synergistic properties. Amongst the toxins, phospholipases-D, which hydrolyze plasma membrane phospholipids, are the most studied toxin family well-known due to their ability to induce same toxicity as provoked by the whole venom during the envenomation, such as the dermonecrosis at the bite site or severe systemic effects that may lead to death. These signs and symptoms, which are named Loxoscelism, start at the main layers of the skin. **Aims:** this work goal to comprehend the *L. intermedia* venom action and recombinant toxins upon epidermal and dermal cell lines, analyzing morphologically and biochemically their responses regarding changes of plasma membrane and cell death. **Methods:** Recombinant PLDs were heterologously expressed and tested to confirm its enzymatic activity. Toxic effects in human keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (HFF-1) in vitro were assessed by confocal microscopy and FACS analyses after in vitro incubation with the whole venom of *L. intermedia* and recombinant toxins. **Results:** The whole venom and recombinant PLDs caused cytotoxicity to HaCat and HFF-1 after 2 hours and 8 hours of incubation, respectively. FACS analysis with annexin V and 7AAD markers corroborate to the microscopic findings with HaCaT and HFF-1. Confocal analyses revealed the binding onto the cell lines surface in a time dependent-manner. **Conclusion:** Data suggest that phospholipase activity is relevant to the cytotoxic effects of the venom and PLDs over skin cell lines, which showed to have distinguishable susceptibility; in fact the differences in cytotoxicity between the cells tested herein could be related to their intrinsic differences, such as in the plasma membrane content.

Poster II apresentado no XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2018.



CELLULAR ASPECTS OF THE TOXICITY OF THE BROWN SPIDER VENOM AND RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D TOXIN IN KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS IN VITRO

Vanessa Ribeiro Heidemann⁽¹⁾, Adriano Marcelo Morgon⁽¹⁾, Paula Deboni^(1,2), Maria Cecília Zoré Meneghetti⁽²⁾, Renan Pelluzzi Cavalheiro⁽²⁾, Marcelo Andrade de Lima⁽²⁾, Helena Bonciani Nader⁽²⁾, Andrea Senff-Ribeiro⁽¹⁾, Luiza Helena Gremiski⁽¹⁾, Silvio Sanches Veiga⁽¹⁾, Olga Meiri Chaim⁽¹⁾.

¹Department of Cell Biology, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.

²Department of Biochemistry, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil



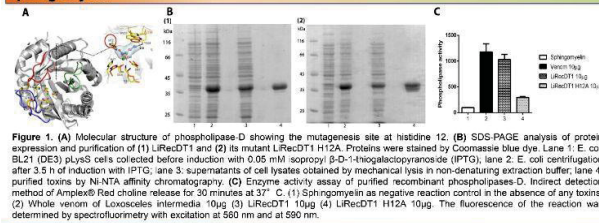
vanne.biomed@gmail.com - (41) 3361-1681

Laboratory of extracellular matrix and biotechnology of venoms - 195

Abstract

Brown spiders venom (*Loxosceles* genus) has been reported to be essentially a mixture of peptides and enzymes with synergistic properties. Amongst the toxins, phospholipases-D, which hydrolyze plasma membrane phospholipids, are the most studied toxin family well-known due to their ability to induce same toxicity as provoked by the whole venom during the envenomation, such as the dermonecrosis at the bite site or severe systemic effects that may lead to death. These signs and symptoms, which are named *Loxoscelism*, start at the main layers of the skin. This work goal to comprehend the *Loxosceles* intermedia venom action and recombinant toxins upon epidermal and dermal cell lines, analyzing morphologically and biochemically their responses regarding changes of plasma membrane and cell death. Recombinant PLDs were heterologously expressed and tested to confirm its enzymatic activity. Toxic effects in human keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (HFF-1) in vitro were assessed by confocal microscopy and FACS analyses after in vitro incubation with the whole venom of *L. intermedia* and recombinant toxins.

Recombinant PLDs expression, purification, and enzyme activity upon sphingomyelin



Morphological changes in keratinocytes and fibroblasts cells in vitro induced by the recombinant PLD toxins and whole venom of Brown spider

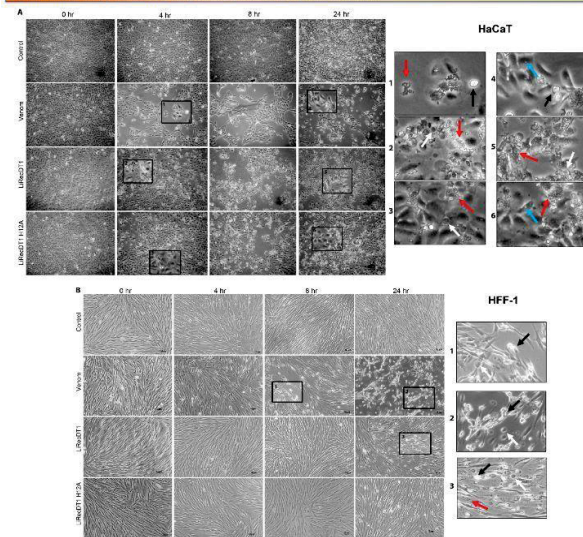


Figure 2. Morphological changes in (A) human keratinocyte cell line (HaCaT) and (B) human fibroblast cell line (HFF-1) exposed to the whole venom of *L. intermedia* (Venom), LiRecDT1, and LiRecDT1 H12A (25µg/mL) incubate during 0, 4, 8, and 24 hours. Negative control: Cells were maintained in serum-free medium. After 4 hours of (A) venom-exposed HaCaT cellular debris (red arrow) and detachment (black arrow) are observed, while LiRecDT1 led to cell retraction (white arrow) and cellular debris (red arrow) and LiRecDT1 H12A showed significantly less cell retraction (white arrow) and cellular debris (red arrow) though. After 24 hours, cellular vacuolization (blue arrow) and deadhesion (black arrow) were observed with the venom, while LiRecDT1 showed more debris (red arrow) and cell retraction (white arrow) than LiRecDT1 H12A (red arrow) and cellular vacuolization (blue arrow). After 8 hours of (B) venom incubation of HFF-1, detached cells (black arrow) were shown; cell retraction (white arrow) and cellular detached (black arrow) with the venom; LiRecDT1 showed lots of debris (red arrow) and cell detachment (black arrow) as well. Magnification 10X, zoomed 2X; images were captured by Zeiss inverted microscope coupled to a Sony Cybershot camera. Scales are depicted at the bottom-right of images.

Metabolic assay of keratinocytes and fibroblasts cells induced by the whole venom and recombinant PLD toxins of Brown spider

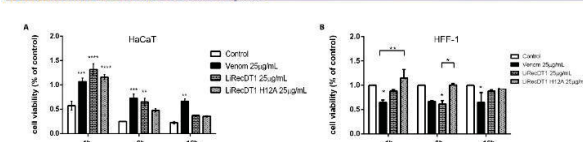


Figure 3. Cell viability analysis according to the MTT method for cytotoxicity. (A) HaCaT and (B) HFF-1 cells were exposed to the whole venom of *L. intermedia* (25µg/mL), LiRecDT1 (25µg/mL), and LiRecDT1 H12A (25µg/mL) after 1, 6, and 16 hours. The cytotoxic effects caused by LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A were assessed. After 1 and 6 hours of incubation, total dehydrogenase activity was increased by all treatments in HaCaT cells compared with negative control. Although at 16 hours, only the whole venom showed higher mitochondrial metabolic activity than the negative control. The experiment (n=2) was performed in pentaplicates and OD_{550nm} values represent the averages ± SEM. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. the control group).

Financial supported by



Binding of PLD-GFP upon HFF-1 by confocal microscopy

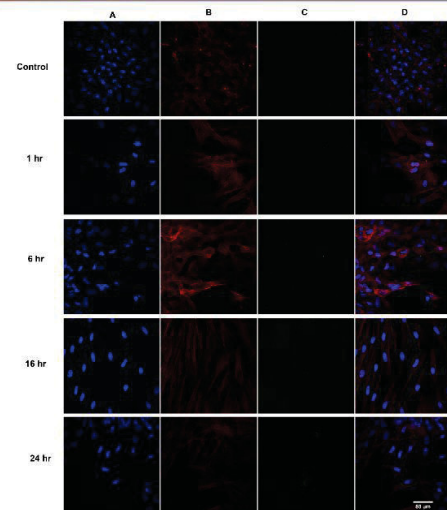


Figure 4. Confocal microscopy analysis of HFF-1 exposed to LiRecDT1-GFP (25µg/mL) after 1, 6, 16, and 24 hours. The immunodetection was performed with non-permeabilized cells aiming to visualize toxin zinging to the membrane. (A) DAPI in blue for nuclei, (B) Phalloidin for F-actin in red, (C) LiRecDT1-GFP in green on cell surface, and (D) Merged images A, B, C at magnification 60X. Images depicted the active toxin localization upon the cell membranes, which LiRecDT1-GFP binding increases onto the cell membrane throughout the time; images were captured by Leica SR GSD 3D microscope and merged by ImageJ software. Scales are depicted at the bottom-right of images.

Internalization of PLD-GFP in HFF-1 by confocal microscopy

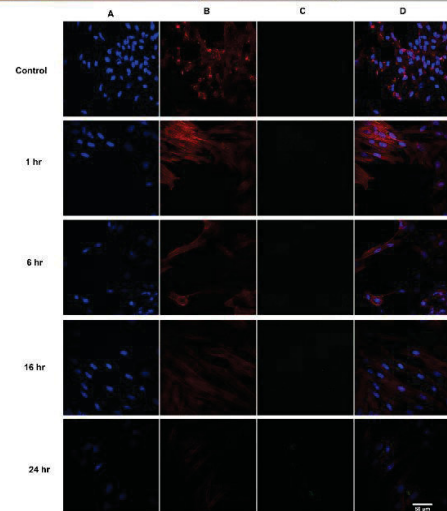


Figure 5. Confocal microscopy analysis of HFF-1 exposed to LiRecDT1-GFP (25µg/mL) after 1, 6, 16, and 24 hours. The immunodetection was performed with permeabilized cells aiming to visualize toxin localization in addition to the intracellular space. (A) DAPI in blue for nuclei, (B) Phalloidin for F-actin in red, (C) LiRecDT1-GFP in green on cell surface, and (D) Merged images A, B, C at magnification 60X. Images depicted the active toxin localization upon the cell membranes, which LiRecDT1-GFP binding increases onto the cell membrane throughout the time; images were captured by Leica SR GSD 3D microscope and merged by ImageJ software. Scales are depicted at the bottom-right of images.

Conclusion

Image analysis of the morphological findings in keratinocytes and fibroblasts showed differences in the cytotoxicity triggered by the whole venom activity, as well the active and mutated toxins, both with respect to the submitted time of incubation. These results are in agreement with cytotoxicity analysis regarding the dehydrogenases in mitochondrial metabolic activity. Phospholipase-D toxin binding and activity upon the cell membrane and its internalization by fibroblasts. It was possible to visualize an increase of aggregates of toxins inside of fibroblast cells. Data suggest that phospholipase activity is relevant to the cytotoxic effects of the venom and PLDs on the skin cell lines, which showed to have distinguishable susceptibility; in fact the differences in cytotoxicity between keratinocytes and fibroblasts tested herein could be related to their intrinsic biochemical differences such as the plasma lipid membrane content.

References

- CHARA, D. M., et al. 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. 84-98, 2011a.
- CHARA, D. M., et al. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venoms: Tools for Biological Purposes. *Toxins (Basel)*, v. 3, p. 305-344, 2011b.
- PUTRELL, J. M. *Loxoscelism*. *Am J Med Sci*, v. 304, p. 261-267, 1992.
- GREINER, L. M., et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venom toxin (LIT) revealed by transcriptome analysis. *Mol Biosyst*, v. 6, p. 2433-2446, 2010.
- LEE, S., et al. L. Brown recluse spider (*Loxosceles* recluse) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J*, v. 391, p. 317-323, 2005.
- RIVERA, I. G., et al. Sphingomyelinase D (SMD) in cell survival and inflammation. *Toxins (Basel)*, v. 7, p. 1457-1469, 2015.

ANEXO V - ARTIGO PUBLICADO

Publicação do artigo científico na revista *Toxins*, em 2019, intitulado: '*Brown Spider (Loxosceles) Venom Toxins as Potential Biotools for the Development of Novel Therapeutics*'.

Review

Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotoools for the Development of Novel Therapeutics

Daniele Chaves-Moreira ¹, Fernando Hitomi Matsubara ¹, Zelinda Schemczssen-Graeff ¹, Elidiana De Bona ¹, Vanessa Ribeiro Heidemann ¹, Clara Guerra-Duarte ² , Luiza Helena Gremski ¹, Carlos Chávez-Olórtegui ² , Andrea Senff-Ribeiro ¹, Olga Meiri Chaim ¹, Raghuvir Krishnaswamy Arni ³ and Silvio Sanches Veiga ^{1,*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba 81531-970, PR, Brazil; moreirad@pennmedicine.upenn.edu (D.C.-M.); fernando_matsubara@hotmail.com (F.H.M.); zelinda1985@hotmail.com (Z.S.-G.); lidibona@gmail.com (E.D.B.); vane.biomed@gmail.com (V.R.H.); luiza_hg@yahoo.com.br (L.H.G.); senffribeiro@gmail.com (A.S.-R.); olgachaim@gmail.com (O.M.C.)

² Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; claragd@gmail.com (C.G.-D.); olortegi@icb.ufmg.br (C.C.-O.)

³ Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto 15054-000, SP, Brazil; arni@sjrp.unesp.br

* Correspondence: veigass@ufpr.br; Tel.: +55-(41)-3361-1776

Received: 6 May 2019; Accepted: 4 June 2019; Published: 19 June 2019



Abstract: Brown spider envenomation results in dermonecrosis with gravitational spreading characterized by a marked inflammatory reaction and with lower prevalence of systemic manifestations such as renal failure and hematological disturbances. Several toxins make up the venom of these species, and they are mainly peptides and proteins ranging from 5–40 kDa. The venoms have three major families of toxins: phospholipases-D, astacin-like metalloproteases, and the inhibitor cystine knot (ICK) peptides. Serine proteases, serpins, hyaluronidases, venom allergens, and a translationally controlled tumor protein (TCTP) are also present. Toxins hold essential biological properties that enable interactions with a range of distinct molecular targets. Therefore, the application of toxins as research tools and clinical products motivates repurposing their uses of interest. This review aims to discuss possibilities for brown spider venom toxins as putative models for designing molecules likely for therapeutics based on the status quo of brown spider venoms. Herein, we explore new possibilities for the venom components in the context of their biochemical and biological features, likewise their cellular targets, three-dimensional structures, and mechanisms of action.

Keywords: brown spider; venom; *Loxosceles*; toxins; biotoools; drug targets; novel therapeutics

Key Contribution: The functional diversity of biological toxins and the often-unique selectivity of their effects coupled with high potency inspire their application or repurposing as research tools and clinical products. This review discusses the chemistry, biology, and clinical effects of some toxins found in brown spider venom that point to potential biotechnological and drug discovery.

1. Introduction: Venom Contents and Cellular Targets

Spider venoms are mixtures of biologically active peptides, proteins, glycoproteins, and small organic molecules which interact with cellular and molecular targets to trigger severe, sometimes fatal effects. However, the spider venom could be particularly interesting for the treatment of general diseases as a scaffold for toxin-based drug research. Several venom-based drugs or venom-derived molecules have found extensive use as tools for therapies. For instance, “Captopril”, a competitive inhibitor of angiotensin-converting enzyme, is broadly used and well-established antihypertensive

drug developed from a polypeptide toxin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*; “Conotoxin” from the sea cone snail *Conus magus* used as an analgesic for severe chronic pain and “exendins”; and, recently, proteins obtained from the saliva of the Gila monster *Heloderma suspectum* benefited the treatment of type II diabetes [1–3].

Brown spiders (genus *Loxosceles*) has a worldwide distribution of approximately 130 species. Accidents caused by *Loxosceles* spider envenomation, Loxoscelism, are characterized by dermonecrotic lesions with gravitational spreading, and hence, these accidents are often referred to as necrotic or gangrenous arachnidism. In minor cases, it unveils systemic manifestations, including renal problems and hematological disturbances such as hemolysis, thrombocytopenia, and intravascular coagulation have been observed [4]. Based on proteomic and transcriptomic analysis, the venoms are mainly composed of low molecular mass peptides, proteins, and glycoproteins enriched in molecules in the 5–40 kDa range. There are three classes of “highly expressed molecules” that comprise approximately 95% of the toxin-encoding transcripts in the venom gland [4,5], biochemically characterized as belonging to the family of phospholipases-D, astacin-like proteases and low molecular mass peptides (ICK peptides or Knottins) [5–8]. Other toxins with low levels of expression have also been identified and include venom allergens, TCTP, hyaluronidases, serine proteases, and serine protease inhibitor [9,10].

Brown spider venom toxins are associated with many cellular changes followed by envenomation, either in humans or in animal-based models for experimental exposure. Rabbit skin exposed to crude venom or human biopsies indicated massive infiltration of inflammatory cells with predominantly polymorphonuclear leukocytes into the dermis, an event associated with dermonecrosis and histologically characterized as aseptic coagulative necrosis [11,12].

Brown spider venom toxins also exhibit indirect and robust activity on blood vessel endothelial cells that cause deregulated activation of leukocytes. The venom activity on endothelial cells was confirmed by experiments performed with umbilical vein endothelial cells, which after venom treatment increased expression and secretion of E-selectin, interleukin-8, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. Additionally, endothelial cells exposed to venom also overexpressed a growth-related oncogene and the monocyte chemoattractant protein-1 [13]. Human keratinocytes treated with venom increased the expression of vascular endothelial growth factor and rabbit aorta endothelial cells treated with venom bound venom toxins on cell surfaces, suffered morphological changes, detached from culture substratum, and their heparan-sulfate proteoglycans were degraded [14,15]. In vivo experiments of animals exposed to venoms indicated endothelial-leukocyte adhesion, transmigration of leukocytes across the blood vessel endothelium and degeneration of blood vessels [15,16]. Other cells targeted by venom toxins are fibroblasts that after exposure deregulated the expression of cytokines genes CXCL1, CXCL2, IL-6, and IL-8 mediators of inflammatory response activation [17]. Erythrocytes represent an additional cell target model of venom toxins. Venom exposure causes hemolysis and morphological changes that seem to depend on a mechanism reflecting a direct effect on cell surface phospholipids such as sphingomyelin and lysophosphatidylcholine leading to the influx of a calcium-mediated pathway by an L-type channel [18–20]; and another complement-dependent pathway with the activation of an endogenous metalloprotease, which degrades glycoproteins and activates complement and lysis [21].

Platelets are also targets of brown spider venoms. Venom toxin treatment of human platelet-rich plasma induced in vitro platelet aggregation, an event that depends on the generation of lipids derived from platelet membranes [22–24]. Additionally, histopathological findings highlighted the marrow depression of megakaryocytes and thrombocytopenia in the peripheral blood after rabbit venom exposure and the generation of thrombus into blood vessels [25,26]. Finally, the cell surface of renal epithelial cells is also targeted by brown spider venom toxins and suffer direct cytotoxicity [27,28].

2. Recombinant Toxins: Biotools and Drug Targets

Brown spider venoms are obtained either by electrically stimulating the cephalothorax, which causes the venom glands to extrude the venom, or by gentle compression of the isolated venom glands

to produce a venom gland extract. Both methods yield only a few microliters and micrograms of proteins from the venom with similar compositions and biological and biochemical properties [29,30]. Spider lethality following electrical stimulation or in the case of gland extract, the fact that they must be sacrificed, are drawbacks [4,5,31]. Molecular biology techniques for studying brown spider venom toxins have helped to overcome these limitations. At least two venom gland cDNA libraries have been constructed from venom glands of *L. laeta* [32] and *L. intermedia* [27]. Additionally, phospholipase-D family members of different brown spider species have been expressed in bacterial systems [22–24,27,32–36]. Site-directed mutant homologs of phospholipase-D have been obtained [18,19,28] and together with recombinant wild-type isoforms have been instrumental for studies on catalysis and determination of the crystal structures of phospholipase-D toxins to provide a better understanding about toxin biology and pharmacology [37–41]. Other recombinant brown spider venom toxins were reported for the astacin-member family [42,43] and an Inhibitor Cystine Knot peptide [44] have also been cloned, expressed and used for studies on the insecticide activities of venoms. A TCTP member-family toxin [10] and a recombinant hyaluronidase from *L. intermedia* venom were heterologously produced and in the case of hyaluronidase used to evaluate its role in dermonecrosis as a spreading factor [6] (see Table 1).

Table 1. Characteristics of recombinant toxins of *Loxosceles* spider venoms.

Toxin Family	MM (kDa)	Species	Biological Characteristics	N° of Sequences	PDB
PLD	30–35	<i>L. arizonica</i> [45] <i>L. boneti</i> [36] <i>L. gaucho</i> [46] <i>L. intermedia</i> [28] <i>L. laeta</i> [32] <i>L. reclusa</i> [34] <i>L. similis</i> [35]	-Hydrolysis of phospholipids; -Transphosphatidylolation; -Dermonecrosis; -Inflammatory response; -Lethality; -Hemolysis; -Platelet aggregation; -Edema; -Nephrotoxicity; -Cytotoxicity; -Cytokine activation; -Complement activation.	199	1XX1 2F9R 3RLH 3RLG 4RW5 4RW3
Metalloprotease	30	<i>L. intermedia</i> [42]	-Hydrolysis of Gelatin, Fibronectin and Fibrinogen; -Cytotoxicity.	3	N.A.
ICK peptides	12	<i>L. intermedia</i> [44]	-Insecticidal activity.	1	N.A.
Hyaluronidase	45	<i>L. intermedia</i> [6]	-Hydrolysis of hyaluronic acid and chondroitin sulfate; -Dermonecrosis spreading.	1	N.A.
TCTP	22	<i>L. intermedia</i> [10]	-Edema; -Vascular permeability.	1	N.A.

N.A.: not applied.

Finally, to surpass problems of expressing recombinant molecules using bacterial systems, such as inability to perform post-translational modifications or production of unfolded/insoluble proteins, brown spider recombinant toxins also have been produced using additional expression models as *Spodoptera frugiperda* insect cells [47,48]. The recombinant toxins produced in invertebrate systems might not only be useful for obtaining additional insights into Loxoscelism, but also serve as important tools for future pharmaceutical studies of prospection for drug discovery, serum therapy, and biotechnological applications (see Figure 1).

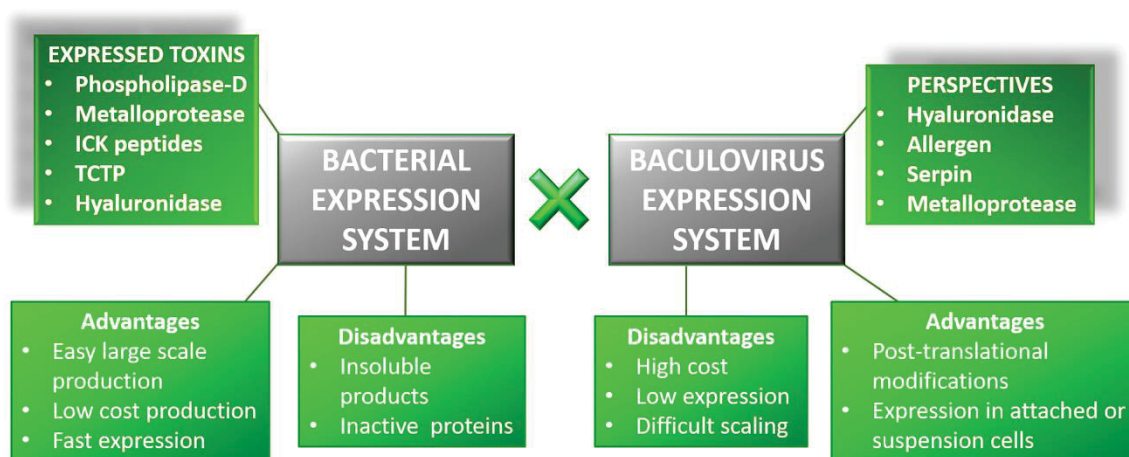


Figure 1. The different systems used for recombinant expression of *Loxosceles* toxins.

3. ICK Peptides: Analgesic Drug, Neuroprotective Effector and Bioinsecticide

Transcriptome analysis of *Loxosceles intermedia* venom glands revealed that 55.9% of the annotated transcripts encoding toxins are related to ICK peptides, also known as knottins, corresponding to the most representative group of identified toxins in this species [9]. ICK peptides contain the inhibitor cystine knot motif, which is an antiparallel β -sheet structured by a pseudo knot formed by two disulfide bonds and the intervening regions of the peptide backbone that is crossed by a third disulfide bond [49]. The ICK motif provides remarkable thermal, chemical, and biological stability and the peptides are overly stable in human serum for several days, conferring high half-life in gastric fluids and are likely relevant in the development of new drugs and therapies [50,51]. The ICK peptides exert their effects on voltage-gated ion channels expressed in the nervous system of animals [49].

For mammals, by acting on these molecular targets, the ICK peptides may be explored for use as analgesics. One example of this potential is the ICK toxin μ -TRTX-Tp1a from the Peruvian green-velvet tarantula *Thrixopelma pruriens* [52]. This toxin is an inhibitor of the $\text{Na}_V1.7$ sodium voltage-gated channel subtype, which is considered a relevant target for therapeutic solutions related to pathophysiological status such as pain. Recombinant μ -TRTX-Tp1a can revert, in a concentration-dependent manner, spontaneous pain induced in mice by intraplantar co-injection with OD1, a scorpion-venom peptide that is a potent activator of $\text{Na}_V1.6$ and $\text{Na}_V1.7$ channels [52,53]. Through in vitro assays, the toxin μ -TRTX-Hd1a, an ICK peptide present in the venom of the spider *Haplopelma doriae*, also activates $\text{Na}_V1.7$ channels. This toxin, at a concentration of 1 μM , was able to almost completely inhibit $\text{Na}_V1.7$ -mediated currents recorded from oocytes expressing Na_V channel subunits [54]. Some authors hypothesized that the molecular targets of the peptide LiTx3 from *L. intermedia* are Na_V channels, which were also shown to be the target for the recombinant peptide U2-SCTX-Li1b encountered in *L. intermedia* venom [7,44]. Na_V or Ca_V channels may be the targets of the peptides LiTx1 and LiTx2 (see Figure 2). Different authors identified and sequenced several peptides that belong to the LiTx family encoded in the venom gland of *L. intermedia* [9]. Thus, the *L. intermedia* venom contains an impressive arsenal of molecules potentially important as an analgesic against acute and chronic pain conditions [9]. In a recent review, Netirojjanakil and Miranda [55] affirm that the challenge of venom-derived peptide therapeutic development remains in improving selectivity to the target and in the delivery of these peptides to the sites of action in the nervous system.

Other putative targets for spider ICK peptides are the acid-sensing ion channels (ASIC) encountered in the human central and peripheral nervous system, mainly in neurons [56]. These channels are specifically pH-modulated (low pH) in the extracellular environment. Depending on the decreasing pH that the neuronal cells are exposed to, the channel can be activated, which initiates sodium transport. The ASIC1a, a subunit of some ASIC channels, has been reported as a target that can be modulated, thus influencing pain or stroke clinical conditions [50]. The ICK peptide PcTx1 from the tarantula

spider *Psalmopoeus cambridgei*, a known ASIC1a specific blocker, is a potent analgesic when intrathecal and intracerebroventricular injected in mice, producing effects similar to morphine [57].

Furthermore, PcTx1 toxin was neuroprotective in focal ischemia studies conducted in adult mouse: intracerebroventricular administration of this ICK peptide was able to reduce the percentage of the ipsilateral hemisphere infarct by more than 50% after 1 h of transient middle cerebral artery occlusion [58]. The authors also demonstrated the PcTx1 neuroprotective effects when this peptide was intracerebroventricular-injected in newborn piglets subjected to hypoxia-ischemia [59]. The ICK structural motif confers increased resistance to proteolysis, unlike the linear peptides that are highly susceptible to this process. Thus, ICK peptides and their respective biological properties possess significant potential for use in basic and applied research. The identification and characterization of these peptides in venoms from *Loxosceles* spiders may lead to the development of important appliances for the therapy of diseases affecting millions of people worldwide.

Studies of ICK peptides PnTx2-6 and PnTx2-5 identified in the venom of *Phoneutria nigreventer* spider shows that these toxins may be applied in the treatment of erectile dysfunction [60]. PnTx2-6 induces priapism in mice even after cavernosal denervation and increases relaxation in rat cavernous strips and in vivo, but induces significant side effects [61]. These unwanted effects and the difficulty to obtain this peptide in large amounts led to the design of a smaller peptide based on PnTx2-6 sequence, which showed promising features for erectile dysfunction treatment [62].

Another application for ICK peptides is the use as bioinsecticides. These peptides act upon targets in the peripheral or central nervous system of the insect inducing paralysis or lethality. The target may be sodium or calcium voltage-dependent channels, as well as calcium-activated potassium channels, presynaptic nerve terminals, or N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors [63]. Concerning to peptides from *L. intermedia*, after chromatography steps, the fraction containing LiTx1, LiTx2, and LiTx3 peptides proved to be toxic for the lepidopteran larvae of *S. frugiperda* resulting in flaccid paralysis or even death [7]. By studying *Loxosceles intermedia* venom gland, a cDNA of a 53 amino acid ICK peptide was obtained, heterologously expressed in the periplasm of *Escherichia coli*, and after purification caused irreversible flaccid paralysis in sheep blowflies. Such ICK peptide is biologically conserved in two other species: *L. laeta* and *L. gaucho* [64]. This biological activity of ICK peptides has an important biotechnological significance since it can lead to the development of effective bioinsecticides against pests of economic interest.

SPECIES	TOXIN	AMINO ACID SEQUENCE
<i>L. intermedia</i> [7]	LiTx1	KCHGDGSKGCATKPDWCCCKNTPCPCPAWSSTSECRCA [*] MDCSRRC [*] K
<i>L. gaucho</i> [61]	LgTx1b	KCHGDGSKGCATQPDWCCCKNTPCPCPAWSSTSECRCA [*] MDCSRRC [*] R
<i>L. laeta</i> [61]	LlTx1a	A [*] CHGDGSKGCATQPDWCCCK [*] TPCPCPAWS [*] DTSECRCA [*] QDCSR [*] SCR [*]
<i>L. intermedia</i> [7]	LiTx2	ACKGEGVKG [*] GCY [*] YE [*] ADDWCCCKTPCPCPAWSHERECRCTQPCNP [*] SCR [*]
<i>L. gaucho</i> [61]	LgTx2a	ACKGEGVKGCA [*] DQ [*] PDWCCCKTPCPCPAWSHERECRCTQPCNP [*] SCR [*]
<i>L. laeta</i> [61]	LlTx2a	ACKGEGVKGCA [*] AE [*] PDWCCCKTPCPCPAWS [*] QTAECRC [*] TQPCNP [*] SCR [*]
<i>L. intermedia</i> [7]	LiTx4	ACKGEGVKG [*] GCY [*] DK [*] PDWCCCKTPCPCPAWSHERECRCTQPCARR [*] CR [*]
<i>L. gaucho</i> [61]	LgTx4b	ACKGEGVKGCA [*] DQ [*] PDWCCCKTPCPCPAWSSTSECRCTQPCNP [*] SCR [*]
<i>L. laeta</i> [61]	LlTx4a	ACKGEGVKG [*] GCY [*] DQ [*] PDWCCCKTPCPCPAWS [*] SSSECRCTQPCPR [*] SCR [*]
<i>L. intermedia</i> [7]	LiTx3	GCIKY [*] GDRCGSPHGLPSNCC [*] NDWKYKGRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDWSKKG
<i>L. gaucho</i> [61]	LgTx3b	GCIKSGDRCGSPHGLPSNCCDDWKYKGRCGCTMGVCTCGPNCPSRGCDYRTKG
<i>L. laeta</i> [61]	LlTx3b	GCIKSG [*] RCGSPHGLPSNCCDDWKYKGRCGCTMGVCTCGKDCPSRGCDWSK [*] P-

Figure 2. Predicted amino acid sequences of representative sequences of ICK peptides screened in RNA extracts from *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*. A fraction of *L. intermedia* containing LiTx1, LiTx2 and LiTx3 proved to be toxic against a lepidopteran larva [7]. A LiTx3 orthologue (Li1b) was heterologously expressed and also showed toxic activity in sheep blowflies [64]. Asterisks indicate conserved cysteine residues and the lines below the alignments indicate the pattern of disulphide bonds that form the inhibitor cystine knot motif [64].

4. Phospholipase-D: Treatment of Loxoscelism, Chemotherapy Drugs, and Anti-Inflammatory Drugs

The phospholipase-D (PLD) family of toxins, also known as dermonecrotic toxins, are the most studied and well-characterized components in *Loxosceles* venoms. These molecules catalyze the degradation of cell membrane phospholipids, such as sphingomyelin (SM), at a terminal phosphodiester bond to release choline and produce ceramide 1-phosphate (C1P) [65]. Also, PLDs can degrade lysophosphatidylcholine (LPC) in an Mg+2 dependent-manner and release lysophosphatidic acid (LPA) [66]. The PLD toxins also catalyze transphosphatidylation of the phosphodiester linkage between the phosphate and head groups of some phospholipids, forming alcohol, and a cyclic ceramide phosphate (CCP) when using SM or cyclic phosphatidic acid (CPA) when using LPC [44]. More than 20% of the transcripts from the *L. intermedia* venom glands corresponded to PLDs [9]. Moreover, the *L. intermedia* transcriptome analysis criteria for bioinformatics screening provided new putative isoforms of PLD, which can be included as new groups in the LoxTox family [67]. These data corroborate the identification of eleven PLD isoforms in the venom of *L. gaucho* and at least twenty-five in the *L. intermedia* venom [68,69]. The PLDs are responsible for a large variety of disturbances in Loxoscelism. Both native and recombinant forms of PLDs have been reported to trigger dermonecrotic lesions, cause an increase in vascular permeability, produce an intense inflammatory response at the inoculation site and at a systemic level, promote platelet aggregation, hemolysis, nephrotoxicity, and even lethality in controlled experiments [18,19,22,28].

The crystal structures of phospholipases-D from *L. laeta*, *L. intermedia*, and *L. gaucho* brought to light several insights about the overall conformation and catalytic mechanism and will direct the inhibitor design [37–40]. The single chain PLDs fold to form a distorted (α/β)₈ barrel where the inner barrel surface lines with eight parallel β -strands linked by short flexible loops to eight α -helices that form the outer surface of the barrel (Figure 3). The catalytic loop is stabilized by a disulfide bridge (Cys51 and Cys57) in phospholipases-D class I (*L. laeta*) and a second disulfide bridge (Cys53 and Cys201) is present only in the phospholipases-D class II (*L. intermedia*), which links the catalytic loop to the flexible loop to significantly reduce the flexibility of the latter loop, as evidenced by the mean

temperature factors [38–40]. Because the α -helices, β -strands, and loops vary in length and character, the barrel is significantly distorted. The interior of the barrel is densely packed with hydrophobic amino acids, and the short N-terminal section and the C-terminal extension, which contains a short α -helix, a β -strand, and a random coiled region serve to cap the torus of the far side of the barrel. The surface loops forming the near side of the barrel are mainly hydrophobic, and a narrow cavity provides access to the catalytic site, which is characterized by a ring of negatively charged amino acids [38–40]. This ring is considered to be the choline-binding site that interacts with Tyr228. The catalytic and Mg^{2+} binding sites are located in a shallow depression and contain His12, Glu32, Asp34, Asp91, His47, Asp52, Trp230, Asp233, Tyr228, and Asn252, which are fully conserved in *Loxosceles* PLDs. Recent site-directed mutagenesis studies of PLDs indicated the involvement of two histidines that are close to the metal ion-binding site in the acid-base catalytic mechanism. Based on the structural results, His12 and His47 of PLD have been identified as the key residues for catalysis and are assisted by a hydrogen bond network that involves Asp52, Asn252, and Asp233. The metal ion is coordinated by Glu32, Asp34, Asp91, and solvent molecules. The substrate is stabilized by Tyr228, and Lys93 [70].

In order to achieve an inhibitor prototype, we searched for possible inhibitors of the PLD from *L. intermedia*, and we discovered that halopemide derivatives could bind and inhibit the recombinant toxin [71]. These molecules, developed to target human PLD and treat cancer, could serve as a prototype for the design of new molecules to specifically treat Loxoscelism [72]. PLDs inhibitors exhibit anti-inflammatory activity and significantly reduce oxidative burst, leukocyte migration, degranulation, and inflammatory cytokine production [73].

Another interesting industrial application of the brown spider recombinant PLD is in the production of diverse beneficial endogenous bioactive lipids such as palmitoylethanolamide (PEA) that have anti-inflammatory and anti-neurodegenerative properties [74]. PEA was shown to reduce tumor necrosis factor alpha, pro-inflammatory cytokines, and prostaglandin E2 in the plasma. The neuroprotective effects of PEA are in part the result of its effects on downregulating the inflammatory cascade. Indeed, many neurodegenerative diseases are associated with a strong inflammatory component, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease or multiple sclerosis.

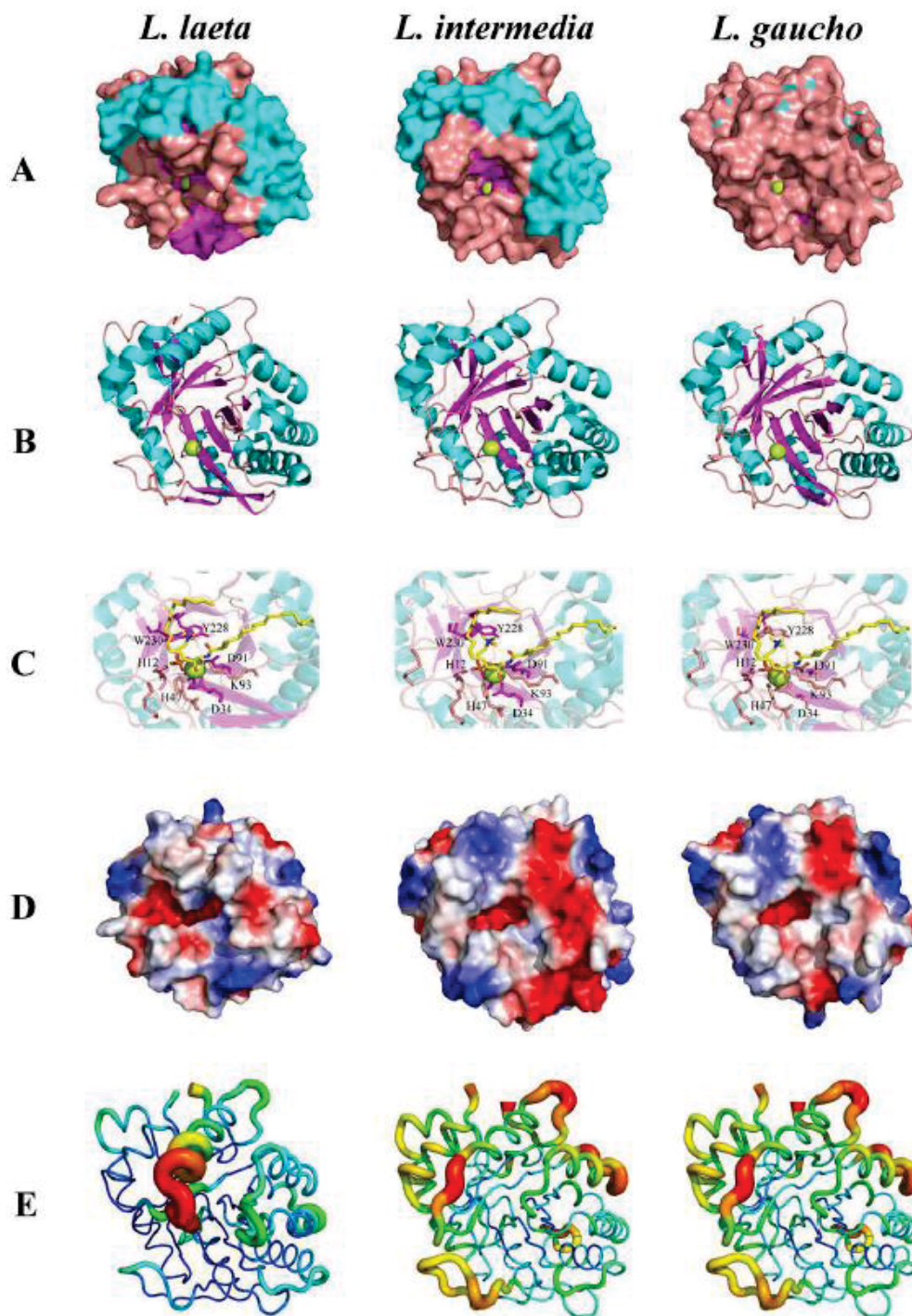


Figure 3. Structural comparison of venom phospholipase-D from *Loxosceles gaucha*, *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta*. (A) Surface view and (B) Ribbon view showing regions of α -helix (cyan), β -Sheet (magenta), Loop (salmon) and Magnesium ion (green sphere). (C) Zoom view of the catalytic site showing conserved amino acid residues (H12, H47, E32, D34, K93, Y228 and W230), Magnesium ion (green sphere), and the sphingomyelin (yellow stick). (D) Electrostatic surface colored by charge, from red (-2 kV) to blue (+2 kV). (E) Flexibility representation generated by b-factor putty, from more rigid regions in blue and green to more flexible regions yellow and red. Models are generated according to PDB codes: 1XX1 (*Loxosceles laeta*) and 3RLH (*Loxosceles intermedia*). Model for *Loxosceles gaucha* was generated using Modeller Program with the LgRec1 sequence from GenBank code: JX866729. PyMOL originated in all figures.

5. Proteases: Matrix Modulator and Thrombolytic Agent

Proteolysis on both the extracellular matrix (ECM) and cell surface modulates symptoms of envenomation by *Loxosceles* spiders [9,75,76]. Studies have revealed the proteolytic activity of the venom obtained directly from gland extracts of *L. rufescens* and *L. intermedia* (thus excluding potential contaminants with oral egesta) [30,77]. Also, transcriptome analyses from venom glands have encountered toxin-coding transcripts for serine-proteases and metalloproteases [9,78]. Proteases were considered highly expressed toxins in the venom glands, reaching about 23% in *L. intermedia*. Notably, metalloproteases were already reported in the whole venom of several species of *Loxosceles* genus [29,42].

Metalloproteases of *Loxosceles* venom are zinc-dependent endopeptidases that hydrolyze a variety of ECM molecules. For instance, two metalloproteases were characterized in the *L. intermedia* venom: Loxolysin A (20–28 kDa) and Loxolysin B (32–35 kDa), which hydrolyzes fibronectin, fibrinogen and denatured type I collagen [29]. Moreover, cDNA library of *L. intermedia* venom gland showed metalloprotease toxin-related sequences identified as astacin-like proteases due to the presence of enzymatic catalytic domain and structural motifs (HEXXHXXGFXHE “catalytic domain” and MX Y “methionine-turn”). The recombinant form of LALP was able to induce morphological changes, such as loss of adhesion of muscular aorta cells in vitro, and hydrolyzed purified fibrinogen and fibronectin [29,30]. Furthermore, the relevance and conservation of metalloproteases for *Loxosceles* genus was also reported as a gene family by the identification of other four different LALP isoforms in the gland venoms of three *Loxosceles* species [43]. Recently, the whole venom complexity of the same species was analyzed using subproteomic and proteomic approaches for LALPs [8]. The majority of LALP-related molecules showed basic or neutral isoelectric points ranging between 24kDa and 29kDa for the three *Loxosceles* venoms.

Nevertheless, the venom toxins revealed different patterns of proteolytic activity upon gelatin and fibrinogen as substrates. These findings corroborate to the existence of a larger group of LALPs and propose the idea of a more intricate role for *Loxosceles* metalloproteases than previously suggested in Loxoscelism [41].

The enzymatic activities of brown spider proteases upon ECM, cell surface, and different proteins highlight these molecules as useful biotools [32]. Considering the physiopathological events related to ECM degradation, these proteases could be used for the establishment of protocol in pharmaceutical research for example as matrix modulator in healing processes, mostly in wound debridement removing the dead or damaged tissue. These proteases can also assist in antibiotic therapy, once some pathogenic bacteria produce biofilms, which in some cases help bacterial adhesion to host tissue and makes the penetration of the antibiotics administered difficult. Another possible application of brown spider proteases are as thrombolytic agents, due to their fibrinolytic activity and anticoagulant property. Although, further studies are necessary to investigate their potential as a therapeutic agent for thrombosis. Besides that, these proteases could participate as biotools in cleaner solutions for denture and contact lenses by removing impregnated proteinaceous materials and prolonging their viability [31,79,80].

6. Serine Protease Inhibitors: Anti-Proliferative and Anti-Metastatic Activities, Adjuvants in the Proteolytic Inhibition and Agricultural Pest Regulators

Inhibitors of serine proteases are grouped in three superfamilies according to their mechanism of action: canonical inhibitors, non-canonical inhibitors and serpins [81,82]. More than 1500 serpin sequences have been identified in the genomes of living organisms, and although they are serine protease inhibitors, several have additional functions as inhibitors of members of the cysteine protease family, caspase, and cathepsin [83,84]. Rather than being considered promiscuous, they appear selective in the sense that the targeted enzymes are often part of a conserved biological mechanism [85]. Human serpins are the most well-characterized serine protease inhibitors because they have a central role in several physiologic processes such as coagulation, fibrinolysis, development, malignancy,

inflammation, and fertilization. Serpins inhibit a variety of circulating proteases as well as proteases that are activated or released in tissue, the reason why these molecules are involved in different pathologies and dysfunctions [86–88]. For instance, serpinopathies can occur due to genetic mutations that lead to inactivation of serpins by protein aggregation with loss of function [89].

Mammal serpins and serpin-derived peptides have been used in preclinical tests as a treatment option for serpinopathies, such as alpha-1 antitrypsin deficiency with emphysema, inflammatory vascular diseases from transplant, inflammatory vasculitic syndromes, and even sepsis with disseminated intravascular coagulation. Serpin-derived peptides are also in development as a new approach to block the adverse effects of serpins upregulated in cancer or inflammation [89].

Serpins are present in animal venoms from snakes, snails, sea anemones, wasps, scorpions, spiders and in ticks' saliva [9,90,91]. The transcriptome analyses of venom glands of *Loxosceles* genus spiders revealed transcripts encoding serine protease inhibitors. The cDNA library of the *L. intermedia* venom gland showed the presence of one serine protease inhibitor-related transcript [9]. In the *L. laeta* transcriptome, 0.6% of the transcripts were related to this same function [78]. The reasons for the presence of protease inhibitors in animal venoms and the physiological targets of these molecules are poorly understood. It has been proposed that these serine protease inhibitors would protect venom toxins from the protease actions of the prey body and manipulate host defenses [92,93]. These inhibitor sequences found in *L. intermedia* and *L. laeta* transcriptome analyses are similar to some tick and mammal serpins. *L. intermedia* serpin shows higher similarity to tick saliva serpins, such as from *Amblyomma americanum*, which is also an arachnid. It is known that arthropod serpins mediate several hemostatic and anti-inflammatory effects in mammalian blood [94]. The saliva serpin 6 and 19 from *A. americanum* contribute to hemostasis dysregulation of the host, facilitating blood feeding. At high molecular excess, recombinant Serpin 19 inhibits several serine proteinases of the blood-clotting cascade and forms inhibitory complexes with Factor Xa, Xia, and trypsin [95,96]. The best-characterized tick saliva serpin is the *Ixodes ricinus* immunosuppressor, Iris, which acts as an anticoagulant and inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines [97].

Inflammation-related complications are already focus of studies using serpins with therapeutic potential: C1 Esterase Inhibitor (C1NH) has been investigated toward many inflammation-related complications, and experimental treatment with this serpin showed decreased tissue complement activation and attenuated renal, intestinal and lung injury in a porcine model for hemorrhage [98]. Recombinant Alpha 1 antitrypsin-Pittsburgh has been investigated as a therapy for sepsis, attenuating the characteristic decreases in the functional concentrations of antithrombin, FXI, and fibrinogen [99].

Another putative biotechnological application for the serine protease inhibitors from *Loxosceles* venoms could be in the oncology field as antitumoral drugs focusing on the prevention of invasion and metastasis. A particular member of the serpin family, maspin, has been previously studied because of its inhibitory potential in breast and prostate cancer development [100]. Recently, the designing novel maspin-based chemotherapeutic agents with improved anti-cancer potency was suggested [101]. Katsukawa and co-workers [102] suggested that serpin 5 secreted by epithelial cells acts as a component of the extracellular surveillance system that facilitates the clearance of premalignant epithelial cells. Scabies mite serine protease inhibitors (SMSs) of the serpin superfamily were reported to interfere with all three pathways of the human complement system at different stages of their activation [103].

Another use of protease inhibitors from the *Loxosceles* spider venom could be the insertion of genes encoding serpins in cultivars, as previously described for some serine protease inhibitors applied in alfalfa, potato, cotton, and tobacco crops, which significantly incremented their resistance to attack by insects and predators [104].

Overall, the advantages of exploring the biotechnological potentials of serpins benefit from modulating serine protease activity by the introduction of serpin, as a therapeutic, or the blockade of serpins (serpin inhibitors). Several drugs currently in use or in development aim to replace dysfunctional serpins and to block adverse effects induced by aberrant protease or serpin actions [89].

7. Hyaluronidases: Adjuvant for Drug Absorption, Diagnostic Allergy Tests, Delivery of Chemotherapy and Contraceptive Molecules

Hyaluronidases (HAases) were reported in *L. deserta*, *L. rufescens*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusa* venom. Proteomic and transcriptomic studies corroborated these data [9,78,105]. *L. intermedia* HAases were described as endo- β -N-acetyl-D-hexosaminidases. The first and unique *Loxosceles* HAase produced in a recombinant form is the Dietrich's HAase from *L. intermedia*, which presents 45 kDa and in vitro activity on hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulfate (CS) degradation [6]. This study using the recombinant isoform confirmed the participation of the HAase as a spreading factor of the dermonecrotic lesion and the inoculated venom. A conserved cystinyl scaffold in the venom HAases suggests a structural similarity with other HAases. Mapping of the sequences of venom HAases on the crystal structure of *Apis mellifera* HAase supported this. Many venom HAases have been found to share a sequence homology of about 36% with that of spermatozoan PH-20, the testicular HAase that participates in fertilization [106]. In contrast to mammalian and microbial HAases, which are extensively studied for their physiological significances, the venom enzymes have received less attention [107].

Enzymes such as HAases have several biomedical applications by cleaving HA in tissues, they render tissues more permeable to injected fluids (spreading effect), increase membrane permeability, and reduce viscosity [108]. HAases have been used to reduce the extent of tissue damage following extravasation of parental infusions as electrolytes, chemotherapeutic agents, and antibiotics. HAases can be used therapeutically to promote resorption of excess fluids, to increase the effectiveness of local anesthesia. Some clinical studies reported that HAases could increase the speed of absorption of other substances, such as a human HAase (rHuPH20) increased insulin dispersion and accelerated its absorption [108].

Venom HAase of arthropods is a major allergen that can induce severe and occasionally fatal systemic IgE-mediated anaphylactic reactions in humans [106]. Determination of structural moieties responsible for the observed allergic potency will have great importance in clinical implications. Recently, the immunogenic potential of the HAase recombinant protein from social wasp (Vespidae) was suggested to its use for developing a diagnostic allergy test, as well as for specific immunotherapy [106,108].

The inhibition of the hydrolytic activities of HAases is also a very promising biotechnological output. Inhibitors of HAase are potent regulating-agents, which play a role in the maintenance of balance between the anabolism and catabolism of HA. The brown spider HAase action during the envenomation contributes to the local effects of the whole venom on the skin as well as potentiating systemic endeavors [106]. Antiserum and inhibitors for the spider HAase are potential agents to attenuate both local and systemic effects of *Loxoscelism*, as it was already demonstrated for other venom HAase [107]. The blockage of HAase activity would widen the time gap between the bite and the antivenom administration by limiting the diffusion of venom components, and it would reduce the antivenom load to achieve effective neutralization and, therefore, to reduce the collateral effects of the serum therapy [107].

8. TCTP: Antiparasitic Effect, Dental Restoration and Drug Delivery

The translationally controlled tumor protein (TCTP), also known as histamine-releasing factor (HRF), is a highly conserved, ubiquitous protein that has both intracellular and extracellular functions [109]. TCTP promotes allergic response in mammalian tissues by inducing the release of histamine from basophiles or mast cells. TCTP family proteins have already been described in the gland secretion of other arthropods, as ixodid ticks [110]. In *Loxosceles* venoms, it was encountered in *L. intermedia* and *L. laeta* transcriptome studies, and immunological cross-reaction studies suggest the presence of this toxin in *L. gaucho* venom [111]. Recombinant *L. intermedia* TCTP (LiRecTCTP) causes edema, increases vascular permeability, and is related to the inflammatory activity of the

venom [10]. A TCTP protein was described in tarantula *Grammostola rosea* venom gland [112] and *Scytodes* spiders [113].

It is suggested that TCTP may play a crucial role in the establishment, maintenance, and pathogenesis of parasite infections. In a mice trial evaluating *Plasmodium* TCTP (42.2% of similarity with LiRecTCTP using EMBOSS Needle tool) as a malaria vaccine, a significant reduction of parasitemia in the early stages of the infection was seen [114,115]. TCTP from worms were also suggested as a putative filarial protein for diagnostic purposes [116]. In *Plasmodium*, TCTP has been shown to bind directly the anti-malarial drug artemisinin and to have higher expression levels on increased drug resistance conditions [117].

Furthermore, TCTP was detected in the biological fluid of asthmatic and parasitized patients [109]. Human TCTP (54.9% of similarity with LiRecTCTP using EMBOSS Needle tool) was described as a therapeutic target in asthma and allergy [109,118]. The N-terminal residues of TCTP (residues 1-10, MIIYRDLISH) form a protein transduction domain (PTD); these domains are recognized as promising vehicles for the delivery of macromolecular drugs. Different studies had already pointed out the TCTP PTD and some derivatives as efficient vehicle for drug delivery [119,120]. Recombinant TCTP from the prawn *Penaeus merguensis* (57.2% of similarity with LiRecTCTP using EMBOSS Needle tool) has been studied as a supplement in dental restorative materials [121]. Recently, this TCTP was shown to promote osteoblast cells proliferation and differentiation, which improve restoration materials and their properties of inducing bone cell proliferation [114].

TCTP is described as a multifunctional protein involved in several cellular processes and is highly conserved [122]. In summary, LiTCTP is a promising toxin and potential target model with regards to its broad biotechnological applications for general biology fields (toxinology, parasitology, allergy, and oncology), and biomaterial research (dental restoration and drug delivery).

9. Brown Spider Venom Toxins: New Immunotherapies

Spider envenoming treatment by antivenom injection is controversial and no adequate clinical trials have been conducted so far. Besides, the best treatment protocol, which involves a combination of serum therapy and other drugs, remains to be established. Nonetheless, this treatment has the best therapeutic potential for treating loxoscelism as it has been shown to be efficient when initiated in time. In 2009, it was demonstrated that the equine-derived polyvalent loxoscelic antivenom produced against an equal proportion mixture of *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* venoms was efficient in reducing the envenoming effects of twice the minimum necrotizing dose of *L. intermedia* venom when administered to rabbits up until 12 h after venom injection [123]. Loxoscelic antivenom was also able to reduce the necrotic area caused by the venom even 48 h post-envenoming [123].

Traditional antivenom production is highly inefficient since it is difficult to obtain the necessary amount of venom to perform the immunization program. Each spider produces only a few microliters of venom. Taking Brazil as an example: there is a demand for 22,000 ampoules of antiloxoscelic serum per year. To produce this amount, 1,800 mg of venom is needed and requires venom extraction from approximately 36,000 spiders. Another important consideration is the toxic effect that crude venom exerts in the producer animal, commonly leading to the development of ulcers and abscesses, compromising the animal's health [124].

The availability of such a diverse group of recombinant PLDs represents an alternative source of immunogens for antivenom production. Recombinant PLDs showed to be active and was used to immunize mice, leading to the production of cross-reactive antibodies, which were also able to protect the animals against lethal effects of the whole venom [124]. In addition, horses immunized with this recombinant PLD developed antibodies that were able to cross-react and neutralize the lethal and dermonecrotic effects of *L. laeta* whole venom from Peru [125]. Antivenom produced using a combination of recombinant PLDs from *L. laeta* and *L. intermedia* as immunogens was tested. The antibodies showed cross-reactivity with the three main species of *Loxosceles* in Brazil and could neutralize their toxics effects more efficiently than an anti-arachnidic commercial antivenom, produced using a

combination of *L. gaucho*, *Phoneutria nigriventer*, and *Tityus serrulatus* venom [126]. A combinational approach was also used with recombinant PLDs from *L. reclusa* and *L. bonetti* spiders (from North American origin), and also *L. laeta*, to immunize horses [127]. Individual immunization was also performed in rabbits. The monovalent antivenoms showed no cross-neutralization between North and South American species. The F(ab)2-based horse polyvalent antivenom showed high neutralizing potency, indicating a possible path for the development of a pan-american anti-loxoscelic antivenom. From *L. gaucho*, only one recombinant PLD has been produced, named LgRec1, which was also able to elicit neutralizing antibodies against the toxic effects of the analogous crude venom [46].

Other approaches for improving production of antiloxoscelic antivenom include the use of synthetic peptides mimicking mapped epitopes within the sequence of the main toxins from these venoms. The authors mapped epitopes from rLiD1 by SPOT assay using anti-rLiD1 antibodies [124]. Six regions were mapped, and the corresponding peptides were synthesized and used to develop an immunization protocol in combination with rLiD1, in different proportions. Although a mixture of six peptides was used, one of them appeared to be immunodominant. All of the used proportions between recombinant PLD and peptides were able to elicit antibodies that recognized rLiD1 by ELISA and neutralized the noxious effects of rLiD1 both in vitro and in vivo. Neutralizing anti-rLiD1 antibodies mapped an immunodominant epitope in a SPOT assay [124]. This epitope has 27 residues and is related to the active site of the enzyme. When used as an immunogen, the 27-mer peptide induces protective antibodies in mice and rabbit, protecting them from lethal and dermonecrotic effects of the venom respectively [128].

A neutralizing monoclonal antibody against *L. intermedia* was produced and its corresponding epitope was mapped by Phage Display techniques [129]. Synthetic peptides corresponding to the mapped epitopes were used as immunogens in rabbits, and the elicited antibodies were able to neutralize 60% of the dermonecrotic activity and 80% of the hemorrhage caused by *L. intermedia* crude venom [130]. To improve the use of molecules mimicking epitopes, chimeric recombinant proteins combining mapped epitopes in the same molecule was conducted with promising results. This approach was used to express in *E. coli* a chimeric non-toxic protein containing three rLiD1 epitopes. These epitopes were previously identified, characterized and validated as potentially neutralizing regions [128–130]. The immunogenicity of the chimeric protein was assessed in rabbits and the developed antibodies neutralized the toxic effects of rLiD1 [131]. The chimeric protein was used in an immunization protocol either alone or combined with crude venom (a mixture of *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*). The three initial doses of the immunization schedule were composed of the venom, and the subsequent dose was composed of the chimeric protein. Compared to the traditional production of antivenom, this combined protocol was able to induce a similar ELISA and Western Blot serum reactivity towards the venoms of the three *Loxosceles* species. In neutralization assays, the sera produced by immunization with the combination of crude venom and chimeric protein met the necessary potency requirements for the actual production of antivenom for therapeutic use in humans. Although the immunization protocol using only the chimeric protein was not completely successful, the combined protocol used 67% less venom when compared to the traditional one, which is significant [132].

Finally, a multi-epitopic chimera containing linear and conformational sequences of the phospholipase-D (dermonecrotic) toxins from the *Loxosceles intermedia* and *L. laeta* venoms, hyaluronidases, and astacins (spreading factors), from the *L. intermedia* venom was produced and used as antigen to generate a polyvalent serum in rabbits. This serum was able to recognize the venoms of three different species of *Loxosceles* involved in accidents in South America (*L. intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta*), besides neutralizing in vitro the enzymatic effects of crude venoms and lethality and dermonecrotic activities in vivo [133]. These results open the possibility of using this synthetic antigen as a tool to obtain new antivenom sera or as antigens for the production of anti-*Loxosceles* vaccines.

10. Conclusions

For most people, spiders often evoke fear and repulsion; however, their venoms form an extensive repertoire of novel molecules, which result in a wide range of biological processes. Several molecules have therapeutic and biotechnological potential and serve as the motif for the development of new molecules with industrial and medicinal applications (Table 2).

Table 2. Overview of potential biotechnological and pharmacological applications of toxins from *Loxosceles* spider venoms.

Toxin Family	Potential Uses as Biotoools	Potential Uses for Drugs Design
Phospholipase-D [22–24,27,33,69,105]	-Antigens for a specific serum production for serum therapy; -Antigens for putative laboratory diagnosis tests; -Production of lipids for industrial interest; -Emulsification-free degumming of oil;	-Treatment of Loxoscelism; -Anti-inflammatory drugs; -Neuroprotective drugs; -Adjuvant drugs for cancer chemotherapy;
Metalloprotease [41–43]	-Trombolytic agents	Treatment of atherosclerosis
ICK peptides [7,44,64]	-Use as Bioinsecticide -Neuroprotective effect	Analgesic drugs
Hyaluronidase [6,9,78]	-Adjuvant for drugs absorption -Resorption of fluids -Diagnostic allergy test -Delivery of chemotherapy	Contraceptive method
Serpin [9,78]	-Inflammatory modulation -Agricultural pest regulators	Antitumoral drugs
TCTP [9,10,78]	-Antiparasitic effect -Dental restoration -Drug delivery	-N.A

N.A: not applied.

After analyses of the brown spider venom glands transcriptome, an expansion of the number of biotechnologically and pharmacologically relevant molecules and drug targets occurred and inspired the identification of a significant number of potential drug targets that can lead to the synthesis of new inhibitors. Moreover, some of these toxins could be used by themselves, as biotoools in biological science projects, pharmaceutical industry or serum therapy, corroborating the high impact of the brown spider venom molecules for biotechnological development. Recent advances in the expression of recombinant toxins have overcome the necessity of obtaining them from a large number of spiders, as they have a very tiny amount of venom (Figure 4). Phospholipases-D, Astacin-like metalloproteases, Inhibitor Cystine Knot peptides, Hyaluronidase and TCTP have been successfully expressed in prokaryote system. The current goal is to promote their biochemical, biological and structural characterization for use them as models for novel therapeutics. All these potential uses and applications for the brown spider toxins are very encouraging. This could appear somewhat remote from the goal of treating diseases, but the challenge of studying the pharmacological properties of the toxins contained in the brown spider venoms can be very surprising. Once these toxins are prove to be versatile, they could be the missing key to discovery an important new drug for a major sickness.

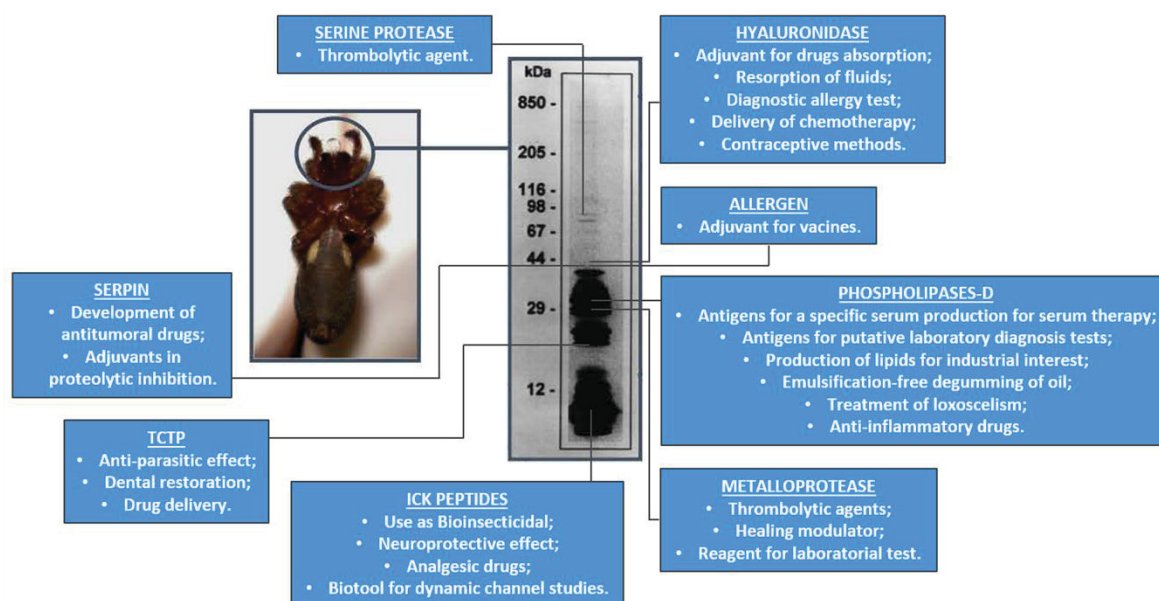


Figure 4. A summary of the *Loxosceles* spider venom toxins and their potential biotechnological and pharmacological applications.

Author Contributions: Conceptualization, D.C.-M. and S.S.V.; Methodology, D.C.-M., and R.K.A.; Resources, C.C.-O., R.K.A. and S.S.V.; Writing-Original Draft Preparation, D.C.-M., F.H.M., Z.S.-G., E.D.B., C.G.-D., A.S.-R. and O.M.C.; Writing-Review & Editing, V.R.H., L.H.G., and A.S.-R.; Visualization, L.H.G.; Supervision, C.C.-O., R.K.A. and S.S.V.; Project Administration, S.S.V.; Funding Acquisition, S.S.V.

Funding: This work was supported by grants from CAPES, CNPq, FAPESP, FAPEMIG, INCTTOX, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-PR/SETI-PR/SESA-PR/MS-Decit/PPSUS, Brazil.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Eng, J.; Kleinman, W.A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufman, J.P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7402–7405. [\[PubMed\]](#)
- Smith, C.G.; Vane, J.R. The discovery of captopril. *FASEB J.* **2003**, *17*, 788–789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Prommer, E. Ziconotide: A new option for refractory pain. *Drugs Today* **2006**, *42*, 369–378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- da Silva, P.H.; da Silveira, R.B.; Appel, M.H.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* **2004**, *44*, 693–709. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- 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.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon* **2014**, *83*, 91–120. [\[CrossRef\]](#)
- 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. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): From cloning to functional characterization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2206. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Araujo, S.C.; Gabriel, M.Y.; Mangili, O.C.; Cruz, I.; Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothakis, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* **2004**, *44*, 273–280. [\[CrossRef\]](#)

8. Trevisan-Silva, D.; Bednaski, A.V.; Fischer, J.S.G.; Veiga, S.S.; Bandeira, N.; Guthals, A.; Marchini, F.K.; Leprevost, F.V.; Barbosa, V.C.; Senff-Ribeiro, A.; et al. A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom. *Sci. Data* **2017**, *4*, 170090. [[CrossRef](#)]
9. 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.; et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* **2010**, *19*, 2403–2416. [[CrossRef](#)]
10. Sade, Y.B.; Boia-Ferreira, M.; Gremski, L.H.; da Silveira, R.B.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; 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.* **2012**, *44*, 170–177. [[CrossRef](#)]
11. Ospedal, K.Z.; Appel, M.H.; Fillus-Neto, J.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Exp. Pathol.* **2002**, *83*, 287–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. 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.; Santoro, M.L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* **2010**, *56*, 972–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Desai, A.; Lankford, H.A.; Warren, J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. *Inflammation* **2000**, *24*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Veiga, S.S.; Zanetti, V.C.; Braz, A.; Mangili, O.C.; Gremski, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34*, 843–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Paludo, K.S.; Gremski, L.H.; Veiga, S.S.; Chaim, O.M.; Gremski, W.; de Freitas Buchi, D.; Nader, H.B.; Dietrich, C.P.; Franco, C.R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon* **2006**, *47*, 844–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. 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. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* **2001**, *102*, 229–237. [[CrossRef](#)]
17. Dragulev, B.; Bao, Y.; Ramos-Cerrillo, B.; Vazquez, H.; Olvera, A.; Stock, R.; Algaron, A.; 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. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 1264–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. 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.; et al. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1811*, 84–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. 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.; et al. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 655–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Chaves-Moreira, D.; Souza, F.N.; Fogaça, R.T.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; 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.* **2011**, *112*, 2529–2540. [[CrossRef](#)]
21. Tambourgi, D.V.; Da Silva, M.S.; Billington, S.J.; Goncalves De Andrade, R.M.; Magnoli, F.C.; Songer, J.G.; Van Den Berg, C.W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* **2002**, *107*, 93–101. [[CrossRef](#)]
22. Appel, M.H.; da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Paludo, K.S.; Silva, D.T.; Chaves-Moreira, D.; da Silva, P.H.; Mangili, O.C.; Senff-Ribeiro, A.; Gremski, W.; et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 167–178. [[CrossRef](#)]
23. 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.; et al. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of

- dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* **2006**, *88*, 1241–1253. [\[CrossRef\]](#)
24. 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.; et al. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie* **2007**, *89*, 289–300. [\[CrossRef\]](#)
 25. Tavares, F.L.; Peichoto, M.E.; Rangel Dde, M.; Barbaro, K.C.; Cirillo, M.C.; Santoro, M.L.; Sano-Martins, I.S. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. *Hum. Exp. Toxicol.* **2011**, *30*, 1567–1574. [\[CrossRef\]](#)
 26. da Silva, P.H.; Hashimoto, Y.; dos Santos, F.A.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2003**, *42*, 155–161. [\[CrossRef\]](#)
 27. 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.; et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211*, 64–77. [\[CrossRef\]](#)
 28. Kusma, J.; Chaim, O.M.; Wille, A.C.; Ferrer, V.P.; Sade, Y.B.; Donatti, L.; Gremski, W.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* **2008**, *90*, 1722–1736. [\[CrossRef\]](#)
 29. Feitosa, L.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; Elias, M.C.; Graner, E.; Mangili, O.C.; Brentani, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* **1998**, *36*, 1039–1051. [\[CrossRef\]](#)
 30. da Silveira, R.B.; Filho, J.F.S.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W.; Nader, H.B. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spider. *Toxicon* **2002**, *40*, 815–822. [\[CrossRef\]](#)
 31. Senff-Ribeiro, A.; Henrique da Silva, P.; Chaim, O.M.; Gremski, L.H.; Paludo, K.S.; da Silveira, R.B.; Gremski, W.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 210–218. [\[CrossRef\]](#)
 32. Fernandes-Pedrosa, F.; Junqueira de Azevedo, I.L.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; van den Berg, C.W.; Ramos, C.R.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 638–645. [\[CrossRef\]](#)
 33. Vuitika, L.; Gremski, L.H.; Belisario-Ferrari, M.R.; Chaves-Moreira, D.; Ferrer, V.P.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 2479–2492. [\[CrossRef\]](#)
 34. Lee, S.; Lynch, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* **2005**, *391 Pt 2*, 317–323. [\[CrossRef\]](#)
 35. Silvestre, F.G.; de Castro, C.S.; de Moura, J.F.; Giusta, M.S.; De Maria, M.; Alvares, E.S.; Lobato, F.C.; Assis, R.A.; Goncalves, L.A.; Gubert, I.C.; et al. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* **2005**, *46*, 927–936. [\[CrossRef\]](#)
 36. Ramos-Cerrillo, B.; Olvera, A.; Odell, G.V.; Zamudio, F.; Paniagua-Solis, J.; Alagon, A.; Stock, R.P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* **2004**, *44*, 507–514. [\[CrossRef\]](#)
 37. Coronado, M.A.; Ullah, A.; da Silva, L.S.; Chaves-Moreira, D.; Vuitika, L.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S.; Chahine, J.; Murakami, M.T.; Arni, R.K. Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2015**, *16*, 768–774. [\[CrossRef\]](#)
 38. de Giuseppe, P.O.; Ullah, A.; Trevisan-Silva, D.; Gremski, L.H.; Wille, A.C.; Chaves Moreira, D.; Ribeiro, A.S.; Chaim, O.M.; Murakami, M.T.; Veiga, S.S.; et al. Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *409*, 622–627. [\[CrossRef\]](#)
 39. Murakami, M.T.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; de Andrade, S.A.; Gabdoulkhakov, A.; Betzel, C.; Tambourgi, D.V.; Arni, R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 323–329. [\[CrossRef\]](#)
 40. Murakami, M.T.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; Tambourgi, D.V.; Arni, R.K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13658–13664. [\[CrossRef\]](#)

41. Trevisan-Silva, D.; Bednaski, A.V.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S.; Senff-Ribeiro, A. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. *Toxicon* **2013**, *76*, 11–22. [\[CrossRef\]](#)
42. da Silva, 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.; et al. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* **2007**, *406*, 355–363. [\[CrossRef\]](#)
43. Trevisan-Silva, D.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; da Silva, R.B.; Meissner, G.O.; Mangili, O.C.; Barbaro, K.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; 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* **2010**, *92*, 21–32. [\[CrossRef\]](#)
44. Matsubara, F.H.; Gremski, L.H.; Meissner, G.O.; Constantino Lopes, E.S.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological crossreactivity approaches. *Toxicon* **2013**, *71*, 147–158. [\[CrossRef\]](#)
45. Lajoie, D.M.; Zobel-Thropp, P.A.; Kumirov, V.K.; Bandarian, V.; Binford, G.J.; Cordes, M.H. Phospholipase D toxins of brown spider venom convert lysophosphatidylcholine and sphingomyelin to cyclic phosphates. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72372. [\[CrossRef\]](#)
46. Magalhães, G.S.; Caporino, 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.; Barbaro, K.C. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie* **2013**, *95*, 1773–1783. [\[CrossRef\]](#)
47. De Bona, E.; (Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil). Personal communication, 2019.
48. Da Justa, H.C.; (Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil). Personal communication, 2019.
49. Norton, R.S.; Pallaghy, P.K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* **1998**, *36*, 1573–1583. [\[CrossRef\]](#)
50. Saez, N.J.; Senff, S.; Jensen, J.E.; Er, S.Y.; Herzig, V.; Rash, L.D.; King, G.F. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins* **2010**, *2*, 2851–2871. [\[CrossRef\]](#)
51. Herzig, V.; King, G.F. The Cystine Knot Is Responsible for the Exceptional Stability of the Insecticidal Spider Toxin ω -Hexatoxin-Hv1a. *Toxins* **2015**, *7*, 4366–4380. [\[CrossRef\]](#)
52. Cardoso, F.C.; Dekan, Z.; Rosengren, K.J.; Erickson, A.; Vetter, I.; Deuis, J.R.; Herzig, V.; Alewood, P.F.; King, G.F.; Lewis, R.J. Identification and Characterization of ProTx-III [μ -TRTX-Tp1a], a New Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitor from Venom of the Tarantula *Thrixopelma pruriens*. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88*, 291–303. [\[CrossRef\]](#)
53. Zimmermann, L.; Morado-Diaz, C.J.; Davis-Lopez de Carrizosa, M.A.; de la Cruz, R.R.; May, P.J.; Streicher, J.; Pastor, Á.M.; Blumer, R. Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 2784–2793. [\[CrossRef\]](#)
54. Klint, J.K.; Smith, J.J.; Vetter, I.; Rupasinghe, D.B.; Er, S.Y.; Senff, S.; Herzig, V.; Mobli, M.; Lewis, R.J.; Bosmans, F.; et al. Seven novel modulators of the analgesic target NaV 1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 2445–2458. [\[CrossRef\]](#)
55. Netirojjanakul, C.; Miranda, L.P. Progress and challenges in the optimization of toxin peptides for development as pain therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 70–79. [\[CrossRef\]](#)
56. Baron, A.; Diochot, S.; Salinas, M.; Deval, E.; Noel, J.; Lingueglia, E. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* **2013**, *75*, 187–204. [\[CrossRef\]](#)
57. Mazzuca, M.; Heurteaux, C.; Alloui, A.; Diochot, S.; Baron, A.; Voilley, N.; Blondeau, N.; Escoubas, P.; Gélot, A.; Cupo, A.; et al. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 943–945. [\[CrossRef\]](#)
58. Pignataro, G.; Simon, R.P.; Xiong, Z.G. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* **2007**, *130 Pt 1*, 151–158. [\[CrossRef\]](#)
59. Yang, M.J.; Lin, W.Y.; Lu, K.H.; Tu, W.C. Evaluating antioxidative activities of amino acid substitutions on mastoparan-B. *Peptides* **2011**, *32*, 2037–2043. [\[CrossRef\]](#)
60. Nunes, K.P.; Torres, F.S.; Borges, M.H.; Matavel, A.; Pimenta, A.M.C.; De Lima, M.E. New insights on arthropod toxins that potentiate erectile function. *Toxicon* **2013**, *69*, 152–159. [\[CrossRef\]](#)

61. Ravelli, K.G.; Ramos, A.T.; Gonçalves, L.B.; Magnoli, F.C.; Troncone, L.R.P. *Phoneutria nigriventer* spider toxin Tx2-6 induces priapism in mice even after cavernosal denervation. *Toxicon* **2017**, *130*, 29–34. [[CrossRef](#)]
62. Nunes-Silva, C.; Nunes, K.P.; Torres, F.S.; Cassoli, J.S.; Santos, D.M.; Almeida, F.D.M.; Matavel, A.; Cruz, J.S.; Santos-Miranda, A.; Nunes, A.D.; et al. PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a *Phoneutria nigriventer* Toxin, Potentiates Erectile Function via NO/cGMP. *J. Urol.* **2015**, *194*, 1481–1490. [[CrossRef](#)]
63. Windley, M.J.; Herzig, V.; Dziemborowicz, S.A.; Hardy, M.C.; King, G.F.; Nicholson, G.M. Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins* **2012**, *4*, 191–227. [[CrossRef](#)]
64. Matsubara, F.H.; Meissner, G.O.; Herzig, V.; Justa, H.C.; Dias, B.C.L.; Trevisan-Silva, D.; Gremski, L.H.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Chaim, O.M.; et al. Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as conserved family in the genus. *Insect Mol. Biol.* **2017**, *26*, 25–34. [[CrossRef](#)]
65. Stock, R.P.; Brewer, J.; Wagner, K.; Ramos-Cerrillo, B.; Duelund, L.; Jernshoj, K.D.; Olsen, L.F.; Bagatolli, L.A. Sphingomyelinase D activity in model membranes: Structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36003. [[CrossRef](#)]
66. van Meeteren, L.A.; Frederiks, F.; Giepmans, B.N.; Pedrosa, M.F.; Billington, S.J.; Jost, B.H.; Tambourgi, D.V.; Moolenaar, W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10833–10836. [[CrossRef](#)]
67. 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.; et al. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 938–946. [[CrossRef](#)]
68. 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.; 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* **2013**, *67*, 17–30. [[CrossRef](#)]
69. Machado, L.F.; Laugesen, S.; Botelho, E.D.; Ricart, C.A.; Fontes, W.; Barbaro, K.C.; Roepstorff, P.; Sousa, M.V. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* **2005**, *5*, 2167–2176. [[CrossRef](#)]
70. Vuitika, L.; Chaves-Moreira, D.; Caruso, I.; Lima, M.A.; Matsubara, F.H.; Murakami, M.T.; Takahashi, H.K.; Toledo, M.S.; Coronado, M.A.; Nader, H.B.; et al. Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1861*, 970–979. [[CrossRef](#)]
71. Chaves-Moreira, D.; Moraes, F.; Caruso, I.; Chaim, O.M.; Senff-Ribeiro, A.; Sussuchi, L.; Chahine, J.; Arni, R.K.; Veiga, S.S. Potential implications for drug design against phospholipase-D from Brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 726–738. [[CrossRef](#)]
72. Selvy, P.E.; Lavieri, R.R.; Lindsley, C.W.; Brown, H.A. Phospholipase D: Enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6064–6119. [[CrossRef](#)]
73. Issuree, P.D.; Pushparaj, P.N.; Pervaiz, S.; Melendez, A.J. Resveratrol attenuates C5a-induced inflammatory responses in vitro and in vivo by inhibiting phospholipase D and sphingosine kinase activities. *FASEB J.* **2009**, *23*, 2412–2424. [[CrossRef](#)]
74. Alhouayek, M.; Muccioli, G.G. Harnessing the anti-inflammatory potential of palmitoylethanolamide. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1632–1639. [[CrossRef](#)]
75. Veiga, S.S.; da Silva, R.B.; Dreyfuss, J.L.; Haoach, J.; Pereira, A.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2000**, *38*, 825–839. [[CrossRef](#)]
76. 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.; et al. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.* **2000**, *32*, 397–408. [[CrossRef](#)]
77. Young, A.R.; Pincus, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* **2001**, *39*, 391–400. [[CrossRef](#)]
78. Fernandes-Pedrosa, F.; Junqueira-de-Azevedo, L.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; Kobashi, L.S.; Almeida, D.D.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 279. [[CrossRef](#)]

79. Chaim, O.M.; Trevisan-Silva, D.; Chaves-Moreira, D.; Wille, A.C.; Ferrer, V.P.; Matsubara, F.H.; Mangili, O.C.; Silveira, R.B.; Gremski, L.H.; Gremski, W.; et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Tools for biological purposes. *Toxins* **2011**, *3*, 309–344. [[CrossRef](#)]
80. Sawant, R.; Nagendran, S. Protease: An enzyme with multiple industrial applications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *3*, 568–579.
81. Otlewski, J.; Krowarsch, D.; Apostoluk, W. Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* **1999**, *46*, 531–565.
82. Krowarsch, D.; Cierpicki, T.; Jelen, F.; Otlewski, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2427–2444. [[CrossRef](#)]
83. Huntington, J.A. Serpin structure, function and dysfunction. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Gatto, M.; Iaccarino, L.; Ghirardello, A.; Bassi, N.; Pontisso, P.; Punzi, L.; Shoenfeld, Y.; Doria, A. Serpins, immunity and autoimmunity: Old molecules, new functions. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2013**, *45*, 267–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Sanrattana, W.; Maas, C.; de Maat, S. SERPINS-From Trap to Treatment. *Front. Med.* **2019**, *6*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Rubin, H. Serine protease inhibitors (SERPINS): Where mechanism meets medicine. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 632–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Davies, M.J.; Lomas, D.A. The molecular aetiology of the serpinopathies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 1273–1286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Lysvand, H.; Helland, R.; Hagen, L.; Slupphaug, G.; Iversen, O.J. Psoriasis pathogenesis—Pso p27 constitutes a compact structure forming large aggregates. *Biochem. Biophys. Rep.* **2015**, *2*, 132–136. [[CrossRef](#)]
89. Lucas, A.; Yaron, J.R.; Zhang, L.; Macaulay, C.; McFadden, G. Serpins: Development for Therapeutic Applications. In *Serpins Methods in Molecular Biology*; Humana Press: New York, NY, USA, 2018; Volume 1826, pp. 255–265.
90. Yuan, C.H.; He, Q.Y.; Peng, K.; Diao, J.B.; Jiang, L.P.; Tang, X.; Liang, S.P. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3414. [[CrossRef](#)]
91. Borges, M.H.; Figueiredo, S.G.; Leprevost, F.V.; De Lima, M.E.; Cordeiro, M.D.N.; Diniz, M.R.; Yates, J.R. Venomous extract protein profile of Brazilian tarantula *Grammostola iheringi*: Searching for potential biotechnological applications. *J. Proteom.* **2016**, *136*, 35–47. [[CrossRef](#)]
92. Zupunski, V.Z.; Kordis, D.; Gubensek, F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett.* **2003**, *547*, 131–136. [[CrossRef](#)]
93. Mulenga, A.; Khumthong, R.; Chalaire, K.C. *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC Genom.* **2009**, *10*, 217. [[CrossRef](#)]
94. Meekins, D.A.; Kanost, M.R.; Michel, A. Serpins in arthropod biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *62*, 105–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Mulenga, A.; Kim, T.; Ibelli, A.M. *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 6 is a cross-class inhibitor of serine proteases and papain-like cysteine proteases that delays plasma clotting and inhibits platelet aggregation. *Insect Mol. Biol.* **2013**, *22*, 306–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Kim, T.K.; Tirloni, L.; Radulovic, Z.; Lewis, L.; Bakshi, M.; Hill, C.; da Silva Vaz, I., Jr.; Logullo, C.; Termignoni, C.; Mulenga, A. Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *Int. J. Parasitol.* **2015**, *45*, 613–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Chmelar, J.; Oliveira, C.J.; Rezacova, P.; Francischetti, I.M.; Kovarova, Z.; Pejler, G.; Kopacek, P.; Ribeiro, J.M.; Mares, M.; Kopecky, J.; et al. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* **2011**, *117*, 736–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Dalle Lucca, J.J.; Li, Y.; Simovic, M.; Pusateri, A.E.; Falabella, M.; Dubick, M.A.; Tsokos, G.C. Effects of C1 Inhibitor on Tissue Damage in a Porcine Model of Controlled Hemorrhage. *Shock* **2012**, *38*, 82–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Colman, R.W.; Flores, D.N.; De La Cadena, R.A.; Scott, C.F.; Cousens, L.; Barr, P.J.; Hoffman, I.B.; Kueppers, F.; Fisher, D.; Idell, S.; et al. Recombinant alpha 1-antitrypsin Pittsburgh attenuates experimental gram-negative septicemia. *Am. J. Pathol.* **1988**, *130*, 418–426. [[PubMed](#)]

100. Schaefer, J.S.; Zhang, M. Hypoxia effects: Implications for maspin regulation of the uPA/uPAR complex. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4*, 1033–1035. [\[CrossRef\]](#)
101. Bernardo, M.M.; Dzinic, S.H.; Matta, M.J.; Dean, I.; Saker, L.; Sheng, S. The Opportunity of Precision Medicine for Breast Cancer with Context-Sensitive Tumor Suppressor Maspin. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 1639–1647. [\[CrossRef\]](#)
102. Katsukawa, M.; Ohsawa, S.; Zhang, L.; Yan, Y.; Igaki, T. Serpin Facilitates Tumor-Suppressive Cell Competition by Blocking Toll-Mediated Yki Activation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 1756–1767. [\[CrossRef\]](#)
103. Mika, A.; Reynolds, S.L.; Mohlin, F.C.; Willis, C.; Swe, P.M.; Pickering, D.A.; Halilovic, V.; Wijeyewickrema, L.C.; Pike, R.N.; Blom, A.M.; et al. Novel scabies mite serpins inhibit the three pathways of the human complement system. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40489. [\[CrossRef\]](#)
104. Christeller, J.; Laing, W. Plant serine proteinase inhibitors. *Prot. Pept. Lett.* **2005**, *12*, 439–447. [\[CrossRef\]](#)
105. 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.; Chávez-Olortegui, C.; Gremski, W.; et al. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 1162–1174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Girish, K.S.; Kemparaju, K.; Nagaraju, S.; Vishwanath, B.S. Hyaluronidase inhibitors: A biological and therapeutic perspective. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2261–2288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Fox, J.W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon* **2013**, *62*, 75–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Girish, K.S.; Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci* **2007**, *80*, 1921–1943. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
109. Macdonald, S.M. Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy. *J. Asthma Allergy* **2012**, *5*, 51–59. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Mulenga, A.; Azad, A.F. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Exp. Appl. Acarol.* **2005**, *37*, 215–229. [\[CrossRef\]](#)
111. Buch, D.R.; Souza, F.N.; Meissner, G.O.; Morgon, A.M.; Gremski, L.H.; Ferrer, V.P.; Trevisan-Silva, D.; Matsubara, F.H.; Boia-Ferreira, M.; Sade, Y.B.; et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. *Toxicon* **2015**, *108*, 154–166. [\[CrossRef\]](#)
112. Kimura, T.; Ono, S.; Kubo, T. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the cDNAs Encoding Toxin-Like Peptides from the Venom Glands of *Tarantula Grammostola rosea*. *Int. J. Pept.* **2012**, 731293. [\[CrossRef\]](#)
113. Zobel-Thropp, P.A.; Correa, S.M.; Garb, J.E.; Binford, G.J. Spit and venom from scytodes spiders: A diverse and distinct cocktail. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 817–835. [\[CrossRef\]](#)
114. Sangsuwan, J.; Wanichpakorn, S.; Kedjarune-Leggat, U. Translationally controlled tumor protein supplemented chitosan modified glass ionomer cement promotes osteoblast proliferation and function. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2015**, *54*, 61–68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Taylor, K.J.; Van, T.T.; MacDonald, S.M.; Meshnick, S.R.; Fernley, R.T.; Macreadie, I.G.; Smooker, P.M. Immunization of mice with *Plasmodium* TCTP delays establishment of *Plasmodium* infection. *Parasite Immunol.* **2015**, *37*, 23–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Fu, Y.; Lan, J.; Wu, X.; Yang, D.; Zhang, Z.; Nie, H.; Hou, R.; Zhang, R.; Zheng, W.; Xie, Y.; et al. Expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) gene of *Dirofilaria immitis* guided by transcriptomic screening. *Korean J. Parasitol.* **2014**, *52*, 21–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. Bommer, U. Cellular Function and Regulation of the Translationally Controlled Tumour Protein TCTP. *Open Allergy J.* **2012**, *5*, 19–32. [\[CrossRef\]](#)
118. Kashiwakura, J.C.; Ando, T.; Matsumoto, K.; Kimura, M.; Kitaura, J.; Matho, M.H.; Zajonc, D.M.; Ozeki, T.; Ra, C.; MacDonald, S.M.; et al. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *J. Clin. Investig.* **2011**, *122*, 218–228. [\[CrossRef\]](#)
119. Bae, H.D.; Lee, K. On employing a translationally controlled tumor protein-derived protein transduction domain analog for transmucosal delivery of drugs. *J. Control. Release* **2013**, *170*, 358–364. [\[CrossRef\]](#)
120. Maeng, J.; Kim, H.Y.; Shin, D.H.; Lee, K. Transduction of translationally controlled tumor protein employing TCTP-derived protein transduction domain. *Anal. Biochem.* **2012**, *435*, 47–53. [\[CrossRef\]](#)
121. Wanachottrakul, N.; Chotigeat, W.; Kedjarune-Leggat, U. Translationally controlled tumor protein against apoptosis from 2-hydroxy-ethyl methacrylate in human dental pulp cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 1479–1487. [\[CrossRef\]](#)

122. Amson, R.; Pece, S.; Marine, J.C.; Di Fiore, P.P.; Telerman, A. TPT1/TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends Cell Biol.* **2012**, *23*, 37–46. [[CrossRef](#)]
123. Pauli, I.; Minozzo, J.C.; da Silva, P.H.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon* **2009**, *53*, 660–671. [[CrossRef](#)]
124. Felicori, L.; Araujo, S.C.; de Avila, R.A.; Sanchez, E.F.; Granier, C.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olórtegui, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon* **2006**, *48*, 509–519. [[CrossRef](#)]
125. Duarte, C.G.; Bonilla, C.; Guimarães, G.; Machado de Avila, R.A.; Mendes, T.M.; Silva, W.; Tintaya, B.; Yarleque, A.; Chávez-Olórtegui, C. 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* **2014**, *93*, 37–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. de Almeida, D.M.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; de Andrade, R.M.; Marcelino, J.R.; Gondo-Higashi, H.; de Azevedo Ide, L.; Ho, P.L.; van den Berg, C.; Tambourgi, D.V. A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: Results of preclinical trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *79*, 463–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Olvera, A.; Ramos-Cerrillo, B.; Estevez, J.; Clement, H.; de Roodt, A.; Paniagua-Solis, J.; Vazquez, H.; Zavaleta, A.; Arruz, M.S.; Stock, R.P.; et al. North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* **2006**, *48*, 64–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Dias-Lopes, C.; Guimarães, G.; Felicori, L.; Fernandes, P.; Emery, L.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chavez-Olortegui, C. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. *Toxicon* **2009**, *55*, 481–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Alvarenga, L.M.; Martins, M.S.; Moura, J.F.; Kalapothakis, E.; Oliveira, J.C.; Mangili, O.C.; Granier, C.; Chávez-Olórtegui, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon* **2003**, *42*, 725–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. de Moura, J.; Felicori, L.; Moreau, V.; Guimaraes, G.; Dias-Lopes, C.; Molina, L.; Alvarenga, L.M.; Fernandes, P.; Frézard, F.; Ribeiro, R.R.; et al. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine* **2011**, *29*, 7992–8001. [[CrossRef](#)]
131. 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. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine* **2013**, *31*, 2749–2755. [[CrossRef](#)]
132. Figueiredo, L.F.; Dias-Lopes, C.; Alvarenga, L.M.; Mendes, T.M.; Machado-de-Avila, R.A.; McCormack, J.; Minozzo, J.C.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olórtegui, C. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. *Toxicon* **2014**, *86*, 59–67. [[CrossRef](#)]
133. Almeida-Lima, S.; Guerra-Duarte, C.; Costal-Oliveira, F.; Mendes, T.M.; Figueiredo, L.F.M.; Oliveira, D.; Ávila, R.A.M.; Ferrer, V.P.; Trevisan-Silva, D.; Veiga, S.S.; et al. Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 653. [[CrossRef](#)]

