Daniel Akio Fukuda

**Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D
de *Loxosceles gaucho* às plaquetas**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto
Butantan/ IPT, para a
obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2017

Daniel Akio Fukuda

**Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D
de *Loxosceles gaucho* às plaquetas**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto
Butantan/ IPT, para a
obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de Concentração:
Biotecnologia

Orientador: Geraldo Santana
Magalhães

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fukuda, Daniel Akio

Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase
D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas / Daniel Akio
Fukuda; orientador Geraldo Santana Magalhães. --
São Paulo, 2017.

69 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Aranhas. 2. Toxinas. 3. Proteínas de
Fluorescência verde. 4. Plaquetas Sanguíneas. I.
Magalhães, Geraldo Santana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas
Tecnológicas

Candidato(a): Daniel Akio Fukuda

Titulo da Dissertação: Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas

Orientador: Dr. Geraldo Santana Magalhães

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

PARECER DAS COMISSÕES INSTITUCIONAIS REGULATÓRIAS
Comissão técnica nacional em Biossegurança- CTNBio

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN**

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Ilma. Sra.
Dra. Kátia Cristina Barbaro
Pesquisador Científico – Instituto Butantan

Prezada Dra. Katia,

Comunicamos que a Comissão Técnica Nacional em Biossegurança – CTNBio, autorizou o desenvolvimento do projeto de pesquisa: “Isolamento, clonagem e expressão de toxinas da glândula de veneno da aranha *loxosceles gaucha* e interação com anticorpos”, dentro do Certificado de Qualidade em Biossegurança 039/98 – CQB 039/98, ao Laboratório de Imunopatologia, com Nível de Biossegurança 2, NB-2. Em anexo encaminhamos o extrato de Parecer Nº 2949/2011, publicado na seção de “Documentos Publicados do DOU” em 21 de junho de 2011 e disponível no site da CTNBio: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/16308.html>.

Atenciosamente,

Viviane Fongaro Botosso
Presidente
CIBio-Instituto Butantan

c/c – Dra. Ana Maria Moura da Silva

Comitê de ética em Pesquisa do Instituto de saúde

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE
INSTITUTO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009.

Protocolo nº: 019/2008 – SES/IS/CEPIS

I – Identificação:

Título: CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES INIBIDORES DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM VENENOS ANIMAIS

Pesquisador: MAYSA SPLENDORE DELLA CASA

Instituição onde se realizará o campo: Instituto Butantan

Instituição responsável: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

Entrada no CEPIS: 30/07/2008

Data da primeira resposta: 20/08/2008.

II - Descrição breve do projeto:

Trata-se de uma pesquisa laboratorial que visa identificar toxinas de eventual ação anti-trombótica presentes em venenos animais, buscando conhecer o potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios na coagulação sanguínea. Para tanto, será realizado um teste sobre a ação anti-trombótica das toxinas utilizando-se plaquetas do sangue humano. Projeto financiado pela FAPESP.

Para a realização do estudo, será colhido sangue de dez doadores saudáveis. A coleta será realizada no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan, por enfermeiras habilitadas. A coleta será repetida em 45 dias. O projeto não deixa claro quantas vezes a coleta será repetida. Também faltam elementos sobre a forma de recrutamento dos doadores, que não foi descrita adequadamente no projeto apresentado. Os critérios de inclusão/exclusão não estão claros e não são apresentadas considerações sobre como uma eventual desistência do doador, caso assim o deseje, será sanada. Essas considerações deverão ser feitas à luz da garantia da autonomia dos participantes do estudo, conforme os princípios norteadores da ética na pesquisa em saúde: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça.

*Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde
Rua Santo Antônio, 550 – Bela Vista – CEP 01314-000 – São Paulo/SP
Tel: (11) 3283-2289 – Site: www.isaude.sp.gov.br
E-mail: cepis@isaude.sp.gov.br – E-mail: sauvedivisa@isaude.sp.gov.br*

Dedico este trabalho à ciência brasileira, na qual ainda acredito

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que acreditam no meu trabalho e me apoiam 100%.

À minha namorada Ana que acompanha minha jornada científica a tanto tempo e que sem seu estímulo esse caminho teria sido muito mais difícil.

À minha enorme família, principalmente meu irmão pelo companheirismo e meus avôs (Nenzinha, Ditian e Batian), que são meus grandes exemplos.

Ao Dr. Geraldo Santana Magalhães que além de orientador foi companheiro de bancada quando necessário, colega de marmita quando os experimentos não nos deixaram almoçar no horário normal e até me ajudou com alguns problemas de bateria do carro.

Às minhas colaboradoras Dra. Maisa S. Della-Casa, Dra. Katia C. Barbaro e Dra. Eliana L. Faquim-Mauro, pelo auxílio nas técnicas e nas importantes correções de texto.

Ao laboratório de imunopatologia, cujos alunos, funcionários e pesquisadores tornaram esses anos não só um tempo de aprendizado mas também de amizade.

Ao grupo da Biologia Molecular, Cris, Paula, Lhiri, Raquel, Junior e tantos outros que passaram por ele, que me ensinaram, ajudaram e torceram pelos meus experimentos.

Aos vampiros do laboratório, Junior, Monica, Ane, Raquel, que me ajudaram na coleta do sangue das minhas pobres vítimas, Lhiri, Paula, Cris e Luciana, tão essenciais para esse trabalho.

Aos amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Colégio Ítaca pela amizade.

AGRADECIMENTO AO FOMENTO

Esse trabalho recebeu suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/23457-9), e CAPES (1216/2011—Edital63/2010—Toxinologia).

“O homem científico não almeja resultados imediatos. Ele não espera que suas ideias mais avançadas sejam rapidamente retomadas. Seu trabalho é como o de um agricultor para o futuro. Seu dever é estabelecer bases para aqueles que estão por vir e apontar o caminho a ser seguido.”

(Nikola Tesla)

RESUMO

FUKUDA, D. A. **Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas**. 2017 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os pacientes picados por aranhas do gênero *Loxosceles* apresentam dermonecrose, agregação plaquetária, insuficiência renal, inflamação local e hemólise. As fosfolipases D (FLD) são os principais componentes no veneno e responsáveis por esses efeitos. Embora as FLDs induzam forte agregação plaquetária, não há estudos mostrando como as FLDs interagem com as plaquetas para promover estes efeitos. Uma vez que muitos agonistas devem interagir com receptores específicos na membrana de plaquetas para induzir a agregação, é possível que de alguma forma as FLDs também possam interagir com plaquetas para induzir esta atividade. Portanto, para investigar esta possibilidade, neste trabalho, uma FLD recombinante de *L. gaucho*, denominada LgRec1, foi fusionada com a proteína fluorescente verde aumentada (EGFP) e usada como uma sonda para detectar a interação de LgRec1 com plaquetas. Essa quimera, denominada EGFP-LgRec1, foi caracterizada comparando suas atividades com a da LgRec1. Foram analisadas as atividades esfingomielinásica utilizando *Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit*, agregação plaquetária determinada em plasma rico em plaquetas humano e hemólise realizada com e sem a presença de soro. Essa quimera foi utilizada para análises qualitativas e quantitativas de sua ligação com plaquetas por microscopia confocal e citometria de fluxo, respectivamente. A microscopia confocal das plaquetas em condição agregante ou não agregante (com ou sem a presença de plasma, respectivamente) mostrou a primeira evidência de que LgRec1 não requer componentes plasmáticos para se ligar às plaquetas, embora estes componentes sejam necessários para LgRec1 induzir agregação plaquetária. Além disso, o uso de Annexina-V marcada mostrou que a ação da LgRec1 leva à exposição de fosfatidilserina. Contudo, esta exposição não está relacionada à morte celular, fato comprovado através da ausência de vazamento de lactato desidrogenase (LDH) após o tratamento com a toxina. Portanto, este trabalho mostra a primeira evidência de que uma FLD de *Loxosceles* se liga as plaquetas promovendo a exposição de fosfatidilserina e, conseqüentemente, induzindo sua agregação pela deposição de fatores de coagulação.

Palavras-chave: Aranhas. Toxinas. Fosfolipase D. *Loxosceles gaucho*. EGFP. Proteína verde fluorescente. Plaquetas. Ligação. Toxina quimérica. Microscopia de Fluorescência. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

FUKUDA, D. A. **Identification of direct binding of a Phospholipase D from *Loxosceles gaucho* to platelets**. 2017 69 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Patients bitten by spiders of the genus *Loxosceles* presents dermonecrosis, platelet aggregation, renal insufficiency, local inflammation, and hemolysis. Phospholipases D (PLD) is the main component in the venom and are responsible for these effects. Although PLDs induce strong platelet aggregation, there are no studies showing how PLDs interact with platelets to promote this effect. Since many agonists must interact with specific receptors on the platelet membrane to induce aggregation, it is reasonable that somehow the PLDs may also interact with platelets to induce this activity. Therefore, to investigate this possibility, in this work, a recombinant PLD from *L. gaucho*, named LgRec1, was fused with the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and used as a probe to detect the interaction of LgRec1 with platelets. This chimera, named EGFP-LgRec1, was characterized by comparing its activities with that of LgRec1. The activities were analyzed: sphingomyelinase using Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit, platelet aggregation was determined in human platelet rich plasma and hemolysis was performed with and without the presence of serum. This chimera was used for qualitative and quantitative analysis of its platelet binding by confocal microscopy and flow cytometry, respectively. Confocal microscopy of platelets in aggregating or non-aggregating condition (with or without the presence of plasma, respectively) showed the first evidence that LgRec1 does not require plasma components to bind to platelets, although these components are required for LgRec1 to induce platelet aggregation. In addition, the use of labeled Annexin-V showed that the action of LgRec1 leads to phosphatidylserine exposure. However, this exposure is not related to cell death, a fact proven by the absence of lactate dehydrogenase (LDH) leakage after treatment with the toxin. Therefore, this work shows the first evidence that a *Loxosceles* PLD binds to platelets promoting the exposure of phosphatidylserine and, consequently, inducing its aggregation by the deposition of coagulation factors.

Keywords: Spiders. Toxins. Phospholipase D. *Loxosceles gaucho*. EGFP. Green fluorescent protein. Platelets. Binding. Chimeric toxin. Fluorescent microscopy. Flow cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

BL21(DE3)pLyz - Cepa de *E. coli* que possui o gene da T7 RNA polimerase em seu cromossomo sob o controle do promotor lacUV5, indutível por IPTG

EGFP - Proteína verde fluorescente otimizada

EGFP - LgRec1 EGFP fusionada na porção N-terminal da LgRec1

FITC – Fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína

FLD - Fosfolipase-D

GFP - Proteína verde fluorescente

IMAC - Cromatografia de afinidade por metal imobilizado

LB - Meio Luria-Bertani

LgRec1 - Fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles gaucho* 1

LiRecDT1 - Fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles intermedia* 1

pAE - Vetor construído a partir dos vetores pET e pRSET. Permite elevado número de cópias de plasmídeo e a produção de proteínas recombinantes com uma pequena 6XHis-Tag na extremidade N-terminal

pAZ - Vetor construído a partir do vetor pAE. Possui uma sequência de 6XHis-tag, seguida pelo gene da EGFP e, então, o sítio de clonagem

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PE - Fluoróforo Ficoeritrina

rpm - Rotações por minuto

SINAM-MS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Ministério da Saúde

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com presença de Dodecil sulfato de sódio

Top10 (DH5 α) - Cepa de *E. coli* que produz uma grande quantidade de plasmídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Notificação dos casos de loxoscelismo no Brasil.....	18
Figura 2 - Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> sp.....	19
Figura 3 - Progressão de loxoscelismo cutâneo de paciente picado em casa enquanto vestia uma blusa.....	20
Figura 4 - Visão esquemática do fluxo de trabalho realizado.....	28
Figura 5 - Visão esquemática do vetor pAZ.....	29

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Ações de FLDs.....	22
-------------------------------------	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>.....	18
1.2 Loxoscelismo.....	19
1.3 Veneno de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>.....	20
1.4 Mecanismos de ação das FLDs.....	24
1.5 Uso da GFP para marcação de proteínas.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Ética.....	28
3.2 Clonagem.....	28
3.1.1 Oligos utilizados.....	28
3.1.2 Clonagem da EGFP-LgRec1.....	28
3.1.3 Ligase.....	29
3.1.4 Seleção de clones positivos.....	29
3.3 Expressão das proteínas recombinantes.....	30
3.4 Purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>).....	31
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
3.6 Western Blot.....	32
3.7 Quantificação da proteína recombinante.....	32
3.8 Espectrometria de massa.....	33
3.9 Atividade esfingomielinásica <i>in vitro</i>.....	33
3.10 Obtenção de células do sangue e soro.....	34
3.10.1 Obtenção do sangue total.....	34
3.10.2 Obtenção de Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	34
3.10.3 Obtenção de Plaqueta lavada.....	34
3.10.4 Obtenção de hemácias lavadas.....	35
3.10.5 Obtenção soro.....	35
3.11 Teste de agregação plaquetária.....	35
3.12 Determinação da atividade hemolítica.....	35
3.13 Imunofluorescência confocal.....	36
3.14 Citometria de fluxo.....	37
5.15 Exposição à fosfatidilserina.....	37

5.16 Identificação de lactato desidrogenase (LDH)	37
5.17 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS.....	39
Artigo “Identification of direct binding of a Phospholipase D from <i>Loxosceles gaucho</i> to platelets”	39
5 CONCLUSÕES.....	58
REFERENCIAS.....	59
ANEXO A: Autorização de uso do artigo “<i>Identification of direct binding of a Phospholipase D from Loxosceles gaucho to platelets</i>”	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

No Brasil, apesar de uma grande diversidade animal e do alto número de acidentes com animais peçonhentos no país, apenas três gêneros de aranhas são considerados de importância médica e estão associados à acidentes: *Phoneutria* (aranha-armadeira); *Latrodectus* (viúva negra) e *Loxosceles* (aranha-marrom) (GREMSKI et al., 2014). Em relação às aranhas do gênero *Loxosceles*, no ano de 2015 foram notificados ao SINAN-MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde) 4.817 casos de acidentes, sendo a grande maioria (4.202 casos) na região sul do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016) (Figura 1). Dentre as espécies desse gênero encontradas no Brasil, *Loxosceles gauchus*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia* causam um número significativo de acidentes no país (CHAVES-MOREIRA et al., 2017)

Figura 1 - Notificação dos casos de loxoscelismo no Brasil. Distribuição dos casos de acidentes notificados por *Loxosceles* no ano de 2015 por região no Brasil. Fonte: SINAN-MS.

As aranhas-marrons são aranhas pequenas, chegando a 5 cm de diâmetro (DA SILVA et al., 2004; GREMSKI et al., 2014). Não são agressivas,

são noturnas e consideradas sinantrópicas, ou seja, se adaptaram perfeitamente ao ambiente doméstico humano, preferindo esconder-se em ambientes com pouca iluminação e movimentação. Devido a esses hábitos, os acidentes ocorrem em sua maioria quando essas aranhas são comprimidas contra o corpo, principalmente no ato de se vestir ou ao se deitar a cama (GREMSKI et al., 2014). Dadas as características do acidente e o fato da picada dessas aranhas ser indolor, somente 10% dos pacientes procuram atendimento médico em até 12 horas após a picada (CARDOSO; YAMAGUCHI; MOURA-DASILVA, 2009).

Figura 2 - Aranhas do gênero *Loxosceles* sp. (A) Aranha *Loxosceles* sp, destaque para o comprimento dessa aranha que pode chegar a 5 cm. (B) Em detalhe na flecha branca a forma de violino no cefalotórax característico deste gênero e na estrela vermelha a disposição dos 3 pares de olhos. (Ferrer, 2010).

1.2 Loxoscelismo

Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever as manifestações clínicas decorrentes da picada de aranhas do gênero *Loxosceles* e pode ter duas manifestações clínicas distintas: o loxoscelismo cutâneo e o loxoscelismo cutâneo-visceral. O loxoscelismo cutâneo representa de 87 a 99% dos casos. Uma vez que a picada é indolor, ela não é percebida e os pacientes procuram atendimento apenas quando os efeitos passam a se manifestar, em 12–24 horas após o acidente. Aproximadamente 6 horas após a picada começa a surgir dor leve, edema e eritema e pós 24 a 36 horas a lesão evolui, formando edema doloroso endurecido, áreas de equimose e isquemia irregular (placa marmórea).

Em alguns casos, pode-se observar uma grande área necrosada com espalhamento gravitacional após alguns dias do acidente. Assim como sua progressão, a recuperação do dano tecidual é lenta, podendo durar até meses (GREMSKI et al., 2014; MALAQUE et al., 2011).

Figura 3 - Progressão de loxoscelismo cutâneo de paciente picado em casa enquanto vestia uma blusa. Ulceração e necrose (A) dia 1; (B) dia 9; (C) dia 16 e (D) dia 25. Fonte: Isbister; Fan, 2011. Foto: Ceila M. S. Málaque.

Outro quadro clínico possível é a manifestação sistêmica chamada loxoscelismo cutâneo-visceral. Esse quadro raro, que ocorre em 1 a 13% dos casos, além de apresentar dano no local da picada pode levar a febre, mal-estar, fraqueza, náuseas, vômitos, hemólise, hematúria, icterícia, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada. Em casos mais graves, a hemólise intravascular pode levar à insuficiência renal e morte, especialmente em crianças (MALAQUE et al., 2011).

1.3 Veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*

O veneno de *Loxosceles* é composto basicamente por proteínas de baixa massa molecular entre 5 e 40 kDa e um conteúdo não proteico composto de

sais inorgânicos, aminoácidos livres, ácidos nucleicos, monoaminas e poliaminas neurotóxicas (DA SILVA et al., 2004; DA SILVEIRA et al., 2002). Estudos demonstraram que o conteúdo proteico do veneno loxoscélico apresenta toxinas dermonecróticas, metaloproteases do tipo astacinas (LALP), hialuronidase, serino-proteases, além de lipases, fosfatase alcalina e 5'-fosfohidrolase ribonucleotídica (GREMSKI et al., 2014).

A análise dos transcriptomas de *L. intermedia* (GREMSKI et al., 2010) e *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008) permitiu a construção de um melhor perfil dos transcritos de toxinas presentes nas glândulas de veneno dessas aranhas, bem como sua abundância relativa. Entre elas, as fosfolipases D (FLDs), também denominadas toxinas dermonecróticas, esfingomielinases D ou SMases, foram identificadas como as mais abundantes, com muitas isoformas que podem estar envolvidas na adaptação das aranhas e na eficácia do veneno.

A família das toxinas dermonecróticas, proteínas de 30 – 35 kDa, foram inicialmente caracterizadas como esfingomielinase - D, uma vez que eram capazes de gerar ceramida 1-fosfato e colina tendo esfingomielinina como substrato (LEE; LYNCH, 2005) assim como hidrolisar lisofosfatidilcolina gerando ácido fosfatídico (LEE; LYNCH, 2005; VAN MEETEREN et al., 2004). No entanto, foi visto que essas proteínas também são capazes de hidrolisar não só esfingofosfolipídios, mas também glicerofosfolipídios (CHAIM et al., 2011a), assim, passou-se a utilizar o termo mais abrangente de fosfolipase D (FLD).

Foi demonstrado que as FLDs podem reproduzir a maioria dos efeitos descritos para todo o veneno, incluindo a dermonecrose (BARBARO et al., 2005; CUNHA et al., 2003), edema (PALUDO et al., 2009), nefrotoxicidade (KUSMA et al., 2008), maciça resposta inflamatória com infiltração de neutrófilos (CHAIM et al., 2011a; TAMBOURGI et al., 2005), hemólise (CHAVES-MOREIRA et al., 2009; FERNANDES PEDROSA et al., 2002; TAMBOURGI et al., 2000) e agregação plaquetária (DA SILVEIRA et al., 2007; GATES; REES, 1990; KURPIEWSKI et al., 1981; MAGALHÃES et al., 2013; TAVARES et al., 2011). A tabela 1 resume as ações promovidas por essa família de proteínas.

Características e ações descritas de Fosfolipases-D (30-35kDa)	
Dermonecrose	APPEL et al., 2008; BARBARO et al., 2005; CHAIM et al., 2006; CUNHA et al., 2003; DA SILVEIRA et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2007; KALAPOTHAKIS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2007; TAMBOURGI et al., 2004; YOUNG; PINCUS, 2001
Hidrolise de lipídios	CHAIM et al., 2011a; LEE; LYNCH, 2005; MURAKAMI et al., 2006; RAMOS-CERRILLO et al., 2004; TAMBOURGI et al., 2004
Hemólise	CHAVES-MOREIRA et al., 2009; FERNANDES PEDROSA et al., 2002 ; RIBEIRO et al., 2007; TAMBOURGI et al., 1995
Agregação plaquetária <i>in vitro</i>	APPEL et al., 2008; DA SILVEIRA et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2007
Infiltração de células inflamatórias	CHAIM et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2007; LEE; LYNCH, 2005
Edema	APPEL et al., 2008; RIBEIRO et al., 2007
Distúrbios renais	CHAIM et al., 2006; KUSMA et al., 2008
Letalidade	APPEL et al., 2008; BARBARO et al., 1996; KUSMA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2007

Citotoxicidade <i>in vitro</i>	<i>in</i>	CHAIM et al., 2006; CHAIM et al., 2011a; KUSMA et al., 2008
Ativação de citocinas	de	BARRETT; ROMINE-JENKINS; BLICK, 1993; DRAGULEV et al., 2007; VAN MEETEREN et al., 2004; TAMBOURGI et al., 1995

Tabela 1 - Ações de FLDs. Modificado de (Chaim et al., 2011b)

As fosfolipases D foram encontradas em diferentes espécies do gênero, como em *L. reclusa* (FUTRELL, 1992), *L. gaucha*, *L. laeta*, *L. intermedia*, *L. deserta* (BARBARO et al., 2005), *L. rufescens* (YOUNG; PINCUS, 2001) e *L. boneti* (RAMOS-CERRILLO et al., 2004), indicando a conservação da proteína no gênero e sua importância biológica. Estudos com *L. gaucha*, *L. laeta* e *L. intermedia* revelaram perfis eletroforéticos semelhantes (BARBARO et al., 1996). Além disso, foi demonstrada a presença de reatividade antigênica cruzada entre o veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* (BARBARO; EICKSTEDT; MOTA, 1994; BARBARO et al., 2005). No entanto, anticorpos monoclonais produzidos contra o componente de 35 kDa do veneno de *L. gaucha* reagiu fracamente com o componente de mesma massa molecular de *L. intermedia* e não reconheceu o componente 32 kDa de *L. laeta* (GUILHERME; FERNANDES; BARBARO, 2001), demonstrando diferenças espécies-específicas entre os venenos das aranhas *Loxosceles*.

Apesar da importância destas toxinas no envenenamento, tem sido um desafio sua caracterização bioquímica e de seus alvos moleculares devido às dificuldades de se obter quantidade suficiente de veneno, dado o tamanho pequeno do animal e a pequena quantidade de veneno produzido. Além disto, são necessárias várias etapas para obter a toxina purificada, resultando em baixo rendimento final. Por estas razões, estratégias de clonagem e expressão heteróloga destas proteínas tem sido empregadas para FLDs de *L. intermedia* (DA SILVEIRA et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2007; TAMBOURGI et al., 2004) e *L. laeta* (CATALÁN et al., 2011; DE SANTI FERRARA et al., 2009; FERNANDES PEDROSA et al., 2002). Embora a clonagem das toxinas destas

espécies tenha sido realizada com sucesso, até recentemente nenhuma FLD de *L. gaucho* havia sido isolada e expressa em sistema heterólogo. Por este motivo, Magalhães et al. (2013) clonaram e expressaram uma FLD desta aranha com atividade biológica, que foi denominada LgRec1. Esta foi a FLD utilizada nesse trabalho.

1.4 Mecanismos de ação das FLDs

O uso de FLDs recombinantes permitiu inúmeros estudos para o entendimento de seu mecanismo de ação. Neste sentido, muitos trabalhos indicam que essas toxinas podem liberar metabólitos bioativos dos lipídeos presentes na membrana celular que, em última instância, promoveriam as atividades biológicas (CHAVES-MOREIRA et al., 2011; GREMSKI et al., 2014). De fato, foi demonstrado que as FLDs de *Loxosceles* hidrolisam a esfingomielina que produz ceramida 1-fosfato ou lisofosfatidilcolina, que uma vez convertida em ácido lisofosfatídico pode desencadear respostas inflamatórias (LEE; LYNCH, 2005; VAN MEETEREN et al., 2004). Assim, parece que as FLDs devem estabelecer alguma interação com os lipídios ou proteínas na membrana celular para exercerem a sua ação. Por exemplo, a ligação de FLDs de *L. intermedia* em melanoma murino B16-F10 (CHAIM et al., 2011) e células endoteliais de aortas de rato (WILLE et al., 2013) demonstrou causar a liberação de colina, um produto gerado pela ação de FLD na esfingomielina.

Além disso, a interação de FLDs com eritrócitos tem sido amplamente estudada devido à hemólise proeminente causada por essas toxinas. Neste caso, foram propostos dois mecanismos diferentes de interação com os eritrócitos para explicar o efeito hemolítico. Previamente, dados da literatura indicam que a hemólise causada pelo veneno loxoscélico e sua fração fosfolipásica é indireta e dependente do complemento (DA SILVA et al., 2004; FUTRELL, 1992; PRETEL et al., 2005; SWANSON; VETTER, 2006; TAMBOURGI et al., 2000; TAMBOURGI et al., 2002; TAMBOURGI et al., 2005; TAMBOURGI et al., 2007). Contudo, foi mostrado que existe uma ligação direta da LiRecDT1 às hemácias (CHAVES-MOREIRA et al., 2009; CHAVES-MOREIRA et al., 2011).

Juntamente com os eritrócitos, as plaquetas representam outro alvo celular para as FLDs, uma vez que estas toxinas podem induzir notável agregação plaquetária (APPEL et al., 2008; DA SILVEIRA et al., 2006; KURPIEWSKI et al., 1981; MAGALHÃES et al., 2013; REES et al., 1988; TAVARES et al., 2011). Este evento está relacionado à trombocitopenia e trombose observadas no envenenamento (TAVARES et al., 2004) que podem agravar a dermonecrose causada pelos FLDs (TAVARES et al., 2016). Apesar da hipótese de que a agregação plaquetária é resultado de lipídios bioativos liberados pela ação dos FLDs (GREMSKI et al., 2014), há algumas indicações de que os componentes plasmáticos são necessários para a agregação plaquetária (GATES; REES, 1990; MAGALHÃES et al., 2013; REES et al., 1988; TAVARES et al., 2011).

Apesar do uso de FLDs recombinantes ter auxiliado em inúmeros estudos bioquímicos, a relação entre FLDs e receptores celulares não foi totalmente elucidada. Uma das abordagens mais interessantes para seguir uma proteína até seu alvo é fusiona-la à proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*). A principal vantagem desta proteína é que seu único pico de excitação (510 nm) adapta-se perfeitamente aos conjuntos de filtro padrão de isotiocianato de fluoresceína (FITC), o que a torna ideal para ser usada como um marcador auto-fluorescente na triagem de células ativadas por fluorescência (FACS) ou microscópio confocal (LSCM) (XIA et al., 2005).

1.5 Uso da GFP para marcação de proteínas

A GFP foi descoberta nos estudos de bioluminescência da água-viva *Aequorea victoria* (SHIMOMURA; JOHNSON; SAIGA, 1962) e sua estrutura primária foi elucidada em 1992 (PRASHER et al., 1992). Essa proteína de 28 kDa possui dois picos de excitação de 395 nm e um menor de 475 nm e um pico de emissão de 509 nm (TSIEN, 1998). Contudo, seu uso possui limitações pois foi visto que quando a GFP é expressa em *E. coli* a formação de sua forma ativa é lenta, exigindo-se 2 horas após sua síntese para sua formação (HEIM; GRIESBECK, 2004), além de formar corpos de inclusão inativos a 37 °C. Outro problema, a intensidade de fluorescência da GFP recombinante é relativamente baixa. Um grande passo para o uso da GFP foi a obtenção da mutante S65T

(HEIM; CUBITT; TSIEN, 1995). Esta mutação resultou em aumento de fluorescência e fotoestabilidade. Além disso, o pico maior de excitação passou para 488 nm, com o pico de emissão a 509 nm mantido, mesmas características espectrais do conjunto de filtros para FITC comumente disponíveis, tornando mais viável o uso de GFP recombinante. Outro passo importante foi a obtenção da EGFP, uma mutante (F64L) com dobramento eficiente a 37 °C e 100 vezes mais fluorescente que a proteína nativa, mantendo as vantagens da mutante S65T (CORMACK; VALDIVIA; FALKOW, 1996).

A clonagem e expressão dessas variantes da GFP possibilitaram a síntese de biomarcadores onde toxinas ou fragmentos foram fusionados à uma dessas proteínas fluorescentes para diversos usos. Um exemplo desta abordagem foi no estudo da toxina da anêmona do mar equinatoxina II, que se liga especificamente a esfingomielina. Essa toxina foi fusionada à GFP e expressa em células de mamífero com objetivo de criar um marcador de esfingomielina celular (BAKRAC et al., 2010). Outros estudos utilizaram desintegrinas de serpente fusionadas à GFP para explorar sua capacidade de identificar integrinas em plaquetas (BUTERA et al., 2005) e em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) (MAGALHÃES et al., 2012). Além disto, um fragmento da toxina tetânica foi fusionando à GFP para estudo de sua distribuição, dinâmica, internalização e tráfico axonal (ROUX et al., 2005) e a fusão desta proteína à subunidade B da toxina da cólera que mostrou que essa subunidade é capaz de ser internalizada por células M17 de neuroblastomas humanos em cultura (KOHLLI et al., 2014).

Assim, a abordagem de biomarcador utilizando GFP pode ser útil para entender melhor o papel das FLD na agregação plaquetária, pois possibilitaria a identificação da ligação da FLD à plaqueta de forma fácil e rápida. Portanto, neste estudo, fusionamos a FLD recombinante LgRec1 de *L. gaucho* com a proteína fluorescente verde aumentada (EGFP) para estudar a interação da LgRec1 com as plaquetas através do uso de microscopia confocal e FACS.

2 OBJETIVO

Identificar a interação da FLD recombinante LgRec1 de *Loxosceles gaucho* com plaquetas humanas.

Objetivos específicos:

- Clonar uma fosfolipase D fusinando-a à EGFP; expressar essa quimera em sistema bacteriano;
 - Avaliar a preservação da atividade fosfolipásica, hemolítica e de agregação plaquetária da quimera;
 - Avaliar por microscopia de fluorescência a capacidade da quimera de marcar plaquetas em condição agregante e não agregante.
 - Quantificar a ligação da quimera com plaquetas via citometria de fluxo.
- Avaliar a exposição de fosfatidilserina por plaquetas após tratamento com LgRec1 e a proteína quimérica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 4 - Visão esquemática do fluxo de trabalho realizado.

3.1 Ética

Toda manipulação de microrganismos foi autorizada pela CTNBio (nº 2949/2011). Todos procedimentos envolvendo sangue humano foram aprovados pelo Comitê de ética em Pesquisa do Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo: 019/2008/SES/IS/CEPIS.

3.2 Clonagem

3.1.1 Oligos utilizados

Para clonagem e seleção de clones positivos foram utilizados os seguintes oligos:

- T7 senso: 5'-TAATACGACTCACTATA-3'
- EGFP antisense 5'-ATTACTGCAGCTTGTACA-3'

3.1.2 Clonagem da EGFP-LgRec1

A químera, com a EGFP fusionada na porção N-terminal da LgRec1 e nomeada EGFP-LgRec1, foi clonada utilizando o gene da LgRec1 anteriormente

obtido (MAGALHÃES et al., 2013). O gene foi retirado do vetor original pAE-LgRec1 digerindo-o com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III para ser subclonado por reação de ligação no vetor pAZ, que contém a sequência da EGFP (BUTERA et al., 2005), previamente digerido com as mesmas enzimas.

Figura 5 - Visão esquemática do vetor pAZ. O sítio de indução PT7 (induzível por IPTG) é seguido por uma cauda de histidina, pela sequência da EGFP, pelo sítio de clonagem (MCS, *multicloning site*) e, finalmente, um sítio de parada (*stop*).

3.1.3 Ligase

O gene de interesse e o respectivo vetor clivados com as mesmas enzimas *Bam*HI e *Hind*III foram submetidos à reação de ligase com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc) de acordo com o manual do fabricante. Os produtos destas reações foram mantidos a 4 °C por 16 horas.

3.1.4 Seleção de clones positivos

Bactérias *E. coli* Top10 (DH5α) quimicamente competentes foram transformadas utilizando cada construção, plaqueadas em placas de meio de cultura LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas por 16 horas a 37 °C. No dia seguinte, foram selecionadas cerca de 20 colônias para análise por reação de PCR (seleção de clones que receberam os insertos do tamanho correto) utilizando oligos que flanqueiam a construção inteira da EGFP-LgRec1. Os produtos dessa reação foram submetidos a um gel de agarose 1% com gel RED (Uniscience) e os clones referentes aos resultados positivos foram incubados por 16 horas em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e posteriormente submetidos à purificação do plasmídeo utilizando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (PROMEGA). Estes plasmídeos contendo os insertos foram então enviados para sequenciamento de DNA no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo.

3.3 Expressão das proteínas recombinantes

Foram selecionados clones que possuem a sequência correta e estes foram utilizados para testes de expressão. Para serem utilizadas como controle, EGFP foi expressa utilizando o vetor pAZ (BUTERA et al., 2005) e LgRec1 foi expressa utilizando o vetor pAE-LgRec1 obtido previamente (MAGALHÃES et al., 2013).

Bactérias BL21(DE3)pLysS quimicamente competentes foram transformadas por choque térmico com as construções de interesse, semeadas em placas de meio de cultura LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas por 16 h a 37 °C. Então, uma colônia de cada placa foi inoculada em 15 mL de meio de cultura LB com 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol e incubadas a 30 °C no caso das quimeras e 37 °C para os controles sob agitação de 180 rpm por 16 horas. No dia seguinte, as culturas foram diluídas na concentração 1:50 (quimeras) e 1:70 (controles) em meio LB suplementado com a mesma concentração de ampicilina apenas.

Para expressão das quimeras, as culturas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 250 rpm até chegarem à fase logarítmica ($DO_{600nm} = 0,5-0,6$). Neste momento uma alíquota de cultura foi retirada como representativo da cultura antes da indução (T_0). Logo em seguida foi adicionado IPTG (isopropiltio- β -tiogalactósido) na concentração final de 1 mM e as culturas foram mantidas por 16 horas a 20 °C. No dia seguinte, outra alíquota foi colhida como representativo da cultura pós indução (T_i). As culturas foram então centrifugadas a 10.000 g a 4 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os extratos bacteriano foram ressuspensos em 0,1 volumes de tampão de lavagem (Fosfato de Sódio 20mM; Cloreto de Sódio 0,5 M, pH 7,0) e estocados a -20 °C até o uso.

Para expressão dos controles, as culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 250 rpm até chegarem à fase logarítmica ($DO_{600nm} = 0,6$). Neste momento uma alíquota de cultura foi retirada como representativo da cultura antes da indução (T_0). Logo em seguida foi adicionado 1 mM de IPTG (Isopropiltio- β -Tiogalactósido) e as culturas foram mantidas por 4 horas nas mesmas condições. Após esse tempo, outra alíquota foi colhida como representativo da cultura pós indução (T_i) e as culturas foram centrifugadas a

10.000 g a 4 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os extratos bacterianos foram ressuspensos em 0,1 volumes de tampão de lavagem (Fosfato de Sódio 20 mM; Cloreto de Sódio 0,5 M) e estocados a -20 °C até o uso.

3.4 Purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, *Immobilized metal ion affinity chromatography*)

Os extratos bacterianos foram submetidos à lise por ultra-som (sonicação) utilizando-se ondas de 500 Watt e 20 kHz e ciclos de pulsos de 50 segundos com intervalos de 4 minutos entre cada pulso, em banho de gelo. O processo foi repetido 4 vezes, com pausa de um minuto entre cada ciclo. Os produtos sonicados foram centrifugados a 10.000 g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado para posterior purificação.

A fração solúvel das células lisadas, foi colocada sobre 2 mL de resina de níquel Ni^{2+} Sepharose® GE® (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), já lavada e equilibrada em tampão de equilíbrio (Fosfato de sódio 20 mM; Cloreto de Sódio 0,5 M, pH 7,4). A reação de ligação da proteína recombinante à resina, foi realizada por cerca de 30 minutos em homogeneizador para tubos tipo gangorra. A seguir foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem (tampão de equilíbrio com adição de Imidazol 70 mM) seguida da eluição (tampão de equilíbrio com adição de Imidazol 1 M) por 30 minutos sob agitação. O eluído foi submetido a um processo de diálise contra tampão Tris (Tris Base 20 mM; NaCl 100 mM; Glicerol 1%, pH 7,4) por 16 horas a -20 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g a 4 °C por 10 minutos para remover qualquer precipitado formado durante o processo de diálise e foram mantidas a 4 °C para posterior uso.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Com o intuito de avaliar a expressão e a purificação das proteínas, as alíquotas To e Ti e amostras das proteínas recombinantes foram submetidas a eletroforese em gel de SDS 12,5 % em condições redutoras com corrente constante de 110 volts e 55 mA por 2 horas. A análise posterior foi realizada corando com Azul Brilhante de Coomassie ou as proteínas foram transferidas do gel de SDS para membrana de nitrocelulose para realizar Western Blot

Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando solução corante contendo Azul Brilhante de Coomassie 0,02% (p/v), dissolvido em metanol 40% (v/v), ácido acético 7% (v/v) e água deionizada q.s.p.(v/v). Os géis foram mantidos nesta solução por 20 minutos em temperatura ambiente, sob agitação constante e descorados com sucessivas trocas de solução descorante (metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água destilada q.s.p.).

3.6 Western Blot

As proteínas fracionadas por eletroforese, foram então transferidas para membrana de nitrocelulose seguindo a metodologia proposta por Towbin, Staehelin e Gordon (1979) de forma adaptada de acordo com o protocolo do fabricante do *Trans-Blot® turbo™ transfer system* (BioRad®). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau S (Merk®) 1:20 para verificar a eficiência da transferência, para retirar o corante as membranas foram lavadas com Tris-salina (Tris 20 mM; NaCl 150 mM, pH 7,5) até completa remoção do mesmo. Após a descoloração, as membranas foram bloqueadas com solução de incubação (Tris-salina e Caseína 5%) por 2 horas sob agitação e então lavadas com solução de lavagem (Tris-salina e Tween 20 0,05%). Em seguida, cada uma das membranas foi incubada por 2 horas, com o anticorpo primário, anticorpo policlonal de coelho anti-LgRec1, 1:8000 em solução de incubação. Após esse período as membranas foram lavadas 3 vezes de 15 minutos com solução de lavagem. Para detectar as proteínas imonorreativas, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com peroxidase diluído 1:1000 em solução de incubação, por 2 horas sob agitação. Após esse período as membranas foram lavadas 3 vezes de 15 minutos com solução de lavagem. Os componentes antigênicos foram detectados pela adição de uma solução com 0,05% de 4-cloro-1-naftol em metanol a 15% v / v, na presença de 0,03% de H₂O₂. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água corrente.

3.7 Quantificação da proteína recombinante

A quantificação das toxinas recombinantes foi realizada através do kit BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific®), uma formulação baseada no

método do ácido bicinonínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total (SMITH et al., 1985). A curva padrão foi obtida a partir da diluição de soro albumina bovina (BSA) 2 mg/mL de acordo com as instruções do fabricante. A reação produzida por este método exibe uma forte absorbância em 562 nm que é aproximadamente linear com as concentrações proteicas crescentes em um intervalo de 200 a 6,25 µg/ml. Desta forma, após a leitura da absorbância de todas as reações, a concentração proteica das proteínas foi determinada a partir da curva padrão construída através das diluições de BSA.

3.8 Espectrometria de Massa

Esse procedimento foi realizado no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Para iniciar o processo de caracterização da proteína quimérica, a massa molecular destas foi confirmada por espectrometria de massa. As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker®) utilizando o procedimento estabelecido para análise da proteína. O procedimento consistiu na aplicação de 0,5 µL de uma solução saturada de ácido sinapínico em etanol, na amostra. Após secar, misturou-se 1 µL da amostra com 1 µL de uma solução saturada de TA30 (0,1 % de ácido trifluoracético/acetonitrila, 70:30) e finalmente 1 µL foi aplicado na placa GroundSteel para ser analisada. A aquisição dos dados foi realizada no modo linear, com polaridade positiva, com os seguintes parâmetros: *Ion Source 1* - 19.50 kV, *Ion Source 2* - 17.60 kV, *Lens* - 9.0 kV, *Pulsed Ion Extraction* 170 ns, *Mass Range* 5 – 70 kDa, *Laser Frequency* 500 Hz, *Detector Gain* 10.0 x. Os resultados foram analisados no software mMass (www.mmass.org).

3.9 Atividade esfingomielinásica *in vitro*

A atividade esfingomielinásica foi medida de forma indireta através do kit *Amplex® Red Sphingomyelinase Assay* (MOLECULAR PROBES), seguindo orientações do fabricante.

Neste ensaio a atividade de esfingomielinase é acompanhada utilizando 10-acetil-3, 7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red Reagent), um fluorogêno

sensível a H₂O₂. Em primeiro lugar, a esfingomielina provoca hidrólise da esfingomielina produzindo ceramida e fosforilcolina. Depois ocorre ação da fosfatase alcalina, que hidrolisa a fosforilcolina, a colina é oxidada pela colina oxidase a betaína e H₂O₂. Finalmente, H₂O₂ na presença de peroxidase, reage com o Amplex Red Reagent para estequiometricamente 1:1 para gerar o produto altamente fluorescente resorufina.

As proteínas nas concentrações de 0,15; 0,05; 0,016 e 0,005 µM, em triplicata foram adicionadas a placa e contendo o reagente mix *Amplex® Red* em volume final de 100 µL. A placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos. As fluorescências de excitação/emissão foram medidas a 540/590 nm em espectrofotômetro Spectramax M2 (Molecular Devices LLC)

3.10 Obtenção de células do sangue e soro

3.10.1 Obtenção do sangue total

Para obtenção de células do sangue humano foi utilizado sangue total colhido com Citrato de Sódio 3,8%. Para obtenção do soro foi colhido sangue total sem a presença de qualquer anticoagulante. Foi utilizado sangue de voluntários saudáveis de ambos os sexos e de idade entre 25 e 40 anos, colhido após consentimento.

3.10.2 Obtenção de Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O sangue total citratado foi centrifugado 115 g por 30 minutos e o sobrenadante foi coletado.

3.10.3 Obtenção de Plaqueta lavada

Plaqueta lavada foi obtida adaptando protocolo descrito anteriormente (SANTORO et al., 1999). Prostaglandina E1 (PGE1) foi adicionada ao PRP na concentração final de 0,25 µg/mL e este foi centrifugado a 1125 g por 15 minutos e o pellet foi lavado duas vezes com Tampão de Lavagem (NaCl 60 mM; NaHCO₃ 2.7 mM; KCl 1.27 mM; Na₂HPO₄ 0.45 mM; MgCl₂ 1.05 mM; Citrato de Sódio 10.98 mM; glicose 0.27 mM; BSA 26.33 mM, pH 6.5), sendo a primeira vez na presença de 0,05 µg/mL. O pellet lavado foi então ressuspensionado em Solução de Tyrode (NaCl 66.9 mM; NaHCO₃ 5.9 mM; KCl 1.47 mM; NaHPO₄

0.31 mM; MgCl₂ 1.05 mM; CaCl₂ 0.63 mM; HEPES 4.99 mM; glicose 22.7 mM, pH 7.4).

3.10.4 Obtenção de hemácias lavadas

Sangue total humano obtido como descrito anteriormente foi centrifugado a 800 g por 10 minutos. O plasma foi descartado e as hemácias lavadas três vezes com Tris-Sacarose (Tris/HCl 10 mM; Sacarose 250 mM; pH 7,4) e centrifugado 2000 g por 5 minutos.

3.10.5 Obtenção soro

Sangue não citratado foi incubado a 37 °C por uma hora em banho-maria e centrifugado 900 g e o soro sobrenadante foi coletado.

3.11 Teste de agregação plaquetária

A agregação de plaquetas em plasma rico em plaquetas (PRP) foi realizada como descrito (MAGALHÃES et al., 2013). A agregação plaquetária foi monitorada em um agregômetro Chrono-log, modelo 490, com a temperatura mantida constante a 37 °C e utilizando uma barra de agitação à velocidade definida para 1000 rpm. A dose de 0,3 µM de LgRec1, EGFP, e EGFP-LgRec1 foi avaliada sobre a agregação plaquetária em intervalos de 30 segundos por 7 minutos. O agonista ADP (concentração final, 10 µM) foi utilizado como controle positivo para agregação plaquetária.

3.12 Determinação da atividade hemolítica

Os testes foram realizados em sextuplicatas, utilizando 1 x 10⁸ hemácias lavadas em 100 µL de proteínas diluídas (0,75; 0,375; 0,187 µM) por poço em placas de 96 poços de fundo em U, em duas condições como se segue:

Atividade hemolítica indireta: hemácias lavadas foram incubadas com EGFP, LgRec1 ou EGFP-LgRec1 (0,75, 0,375 e 0,187 µM, cada) durante 4 horas a 37 ° C. Após esse período, as hemácias foram incubadas com 50 µL de soro e o controle positivo incubado com 1% de Triton X-100 durante 1 hora a 37 ° C sob agitação.

Atividade hemolítica direta: As hemácias lavadas foram incubadas com EGFP, LgRec1 ou EGFP-LgRec1 (0,75, 0,375 e 0,187 μ M, cada) na presença de 1 mM de Ca^{2+} durante 12 horas a 37 °C. Após esse período, as hemácias foram incubadas com 50 μ L de Tris-Sacarose e o controle positivo foi realizado como acima.

Após a incubação, a placa foi centrifugada a 2000 g durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo chato e lido a 415 nm. Os valores foram convertidos para percentagem considerando 100% de hemólise causada pelo Triton X-100. Para os testes, soro e glóbulos vermelhos do mesmo doador foram utilizados para prevenir a ativação do complemento pelo reconhecimento de anticorpos pelo sistema sanguíneo ABO.

3.13 Imunofluorescencia confocal

Para avaliar se a proteínas quiméricas se ligam às plaquetas foi realizado dois testes de microscopia de imunofluorescência confocal, em condição agregante e com plaqueta lavada e fixada (condição não agregante).

Marcação de plaqueta em condição não agregante: As plaquetas lavadas (4×10^8 plaquetas) foram fixadas em lâminas de microscópio utilizando a Solução Fixativa (Metanol 100%) do kit HEMA 3® (Thermo Fisher Scientific) e lavadas com água. As plaquetas fixadas foram incubadas com 500 μ L de LgRec1 mais EGFP, EGFP ou EGFP-LgRec1 (4 μ M, cada) nas lâminas de microscópio durante 2 horas a 37 °C e depois lavadas 3 vezes com a solução de Tyrode.

Marcação de plaqueta em condição agregante: PRP (4×10^8 plaquetas) foram incubadas com 500 μ L de LgRec1 mais EGFP, EGFP ou EGFP-LgRec1 (4 μ M, cada) em tubos de vidro siliconados durante 2 horas a 37 °C e depois lavadas 3 vezes com a solução de Tyrode. Em seguida, o agregado de plaquetas foi transferido para lâminas de microscópio.

Após incubação, as amostras foram então observadas utilizando um microscópio confocal de fluorescência (Confocal Radiance 2,100, BioRad, Hercules) acoplado com uma Nikon-Eclipse E800 com objetiva Plan-Apochromatic (Sciences and Technologies Group Instruments Division).

3.14 Citometria de fluxo

A ligação da proteína quimérica à plaqueta foi quantificada em um citômetro de fluxo (BD FACSCalibur System). As plaquetas lavadas (4×10^8 células) foram incubadas com EGFP, LgRec1 mais EGFP ou EGFP-LgRec1 (4 μ M, cada) durante 2 horas a 37 °C. As plaquetas lavadas tratadas foram separadas dos detritos com base nos perfis de dispersão do feixe. A marcação positiva foi definida como aquela com uma intensidade de fluorescência acima da apresentada pelas plaquetas não tratadas. A percentagem de células marcadas foi calculada a partir de plaquetas não tratadas utilizando o software FlowJo (FlowJo LLC). Os dados de 100.000 eventos foram coletados e analisados. Todas as amostras foram realizadas em duplicata.

5.15 Exposição à fosfatidilserina

Para verificar se as proteínas causam a exposição de fosfatidilserina foi utilizada a anexina-V, que possui especificidade para esse fosfolípide. Para tal, foi utilizado o Kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences) em um citômetro de fluxo (BD FACSCalibur System, Becton Dickinson). As plaquetas lavadas (4×10^8 células) foram incubadas com EGFP, LgRec1 mais EGFP ou EGFP-LgRec1 (4 μ M, cada) durante 1 hora e 45 minutos a 37 °C. A Anexina V marcada com o fluorófilo PE (ficoeritrina) foi então adicionada e incubada durante 15 min à temperatura ambiente (25 °C) no escuro, de acordo com o protocolo do fabricante. As plaquetas foram separadas dos detritos com base nos perfis de dispersão do feixe. Todas as amostras foram realizadas em duplicata (10^4 eventos por arquivo de aquisição de dados). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (FlowJo LLC) e os resultados expressos como a percentagem de células positivas para PE-Anexina V calculadas a partir de plaquetas não tratadas.

5.16 Identificação de lactato desidrogenase (LDH)

A liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) para o sobrenadante das plaquetas foi determinada como um marcador da integridade da membrana celular. As plaquetas lavadas (4×10^8 células / mL) foram incubadas com EGFP, LgRec1 mais EGFP ou EGFP-LgRec1 (4 μ M, cada)

durante 15 minutos a 37 ° C. Os controle de citólise negativo e positivo consistiram no sobrenadante de células não tratadas e de células incubadas com 0,1% (v / v) de Triton X-100, respectivamente. Após incubação, as células foram centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar o vazamento de lactato desidrogenase a partir de plaquetas utilizando o *LDH Cytotoxicity Assay Kit* (Cayman Chemical) seguindo o protocolo do fabricante.

5.17 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Bonferroni no software GraphPad Prism 5, versão 5.01, 2007. (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, EUA). A significância foi considerada quando $p \leq 0,05$. (MAGALHÃES et al., 2013).

4 RESULTADOS

Artigo submetido para revista *Toxins* dia 27 de abril de 2017.

Article

Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* binds to platelets and promote phosphatidylserine exposure

Daniel A. Fukuda, Maria C. Caporrino, Katia C. Barbaro, Maisa S. Della-Casa, Eliana L. Faquim-Mauro and Geraldo S. Magalhães *

Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, Av. Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil; dakiofukuda@gmail.com (D.A.F.); maria.caporrino@butantan.gov.br (M.C.C.); katia.barbaro@butantan.gov.br (K.C.B.); maisa.dellacasa@butantan.gov.br (M.S.D.C.); eliana.faquim@butantan.gov.br (E.F.L.M.)

* Correspondence: geraldo.magalhaes@butantan.gov.br; Tel.: +55-11-2627-9777 or +55-11-98748-9390

Abstract: Spiders from the genus *Loxosceles* are frequently reported as a cause of necrotic lesions in humans around the world. Among many components found in the venom of *Loxosceles* genus, the phospholipases D (PLDs) are the most investigated since they can cause massive inflammatory response, dermonecrosis, hemolysis and platelet aggregation among others. Even though the PLDs induce strong platelet aggregation, there are no studies showing how the PLDs interact with platelets to promote this effect. Since many agonists must interact with specific receptors on platelet membrane to induce aggregation, it is reasonable that somehow the PLDs may also interact with platelets to induce this activity. Therefore, to address this possibility, in this work, a recombinant PLD, called LgRec1, from *L. gaucho* was fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and used as a probe to detect the interaction of LgRec1 to platelets by fluorescence activated cell sorter (FACS) and confocal microscopy. The preservation of biological activities of this chimera toxin was also analysed. The results show the first evidence that LgRec1 does not require plasma components to bind to platelets, although these components are necessary to LgRec1 induce platelet aggregation. Also, the attachment of LgRec1 to human platelets cell membrane suggests the exposure of phosphatidylserine (PS) that may act as a scaffold for coagulation factors. Therefore, the results add new information about the binding of PLD to platelets and the EGFP-LgRec1 may be a useful tool to investigate the binding of this toxin to other cells.

Keywords: Phospholipase D; *Loxosceles gaucho*; EGFP; platelets; binding; chimera toxin

1. Introduction

Envenomation by spiders of the *Loxosceles* genus, also known as brown spiders, can cause significant clinical manifestations in human and some fatalities in specific cases [1]. In Brazil, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta*, and *Loxosceles gaucho* spiders are the most important species causing the highest number of accidents [2,3] with thousands of cases being reported annually [4]. To better understand the venom composition, many of its components have been

identified such as serine-proteases [5], hyaluronidases [6,7], insecticidal toxins [8], metalloproteases [5,9] and phospholipases D [10-12] among others.

The transcriptome analysis of *L. intermedia* [13] and *L. laeta* [14], allowed the construction of a better profile of the toxins transcripts present in the venom glands of these spiders as well as their relative abundance. Among them, the phospholipases D (PLDs), also called dermonecrotic toxins, sphingomyelinases D or SMases, were identified as the most abundant with many isoforms that may be involved in the adaptation of the spiders and the effectiveness of the venom. It has been shown that the PLDs can reproduce most of the effects described to the whole venom, including dermonecrosis [11,12]; edema [15], nephrotoxicity [16], massive inflammatory response with neutrophil infiltration [17,18], hemolysis [19-21] and platelet aggregation [22-26]. Although considerable effort has been made to understand how the PLDs perform their activities, this task is hampered by several steps required for their purification and the small amount of venom extracted from the spiders. To overcome this problem, many of these toxins have been cloned and expressed in the bacterial system [27]. In this regard, our group also cloned and characterized the first PLD from *L. gaucho*, called LgRec1. This toxin showed the main biological activities of the venom, such as dermonecrosis, hemolysis and platelet aggregation [26].

The use of recombinant PLDs allowed several studies to understand their mechanism of action. In this regard, many works indicate that these toxins can release bioactive metabolites from the lipids present in the cell membrane that ultimately would promote the biological activities [28,29]. In fact, it has been shown that *Loxosceles* PLDs hydrolyze sphingomyelin (SM) generating ceramide 1-phosphate (C1P) or lysophosphatidylcholine (LPC), that once converted to lysophosphatidic acid (LPA), can trigger inflammatory responses [30,31]. Thus, it seems that the PLDs must establish some interaction with the lipids or proteins on the cell membrane to exert their action. For instance, the binding of PLDs from *L. intermedia* on B16-F10 murine melanoma [18] and rat aortic endothelial cells [32] has shown to cause the release of choline, a product generated by the action of PLD on sphingomyelin. In addition, the interaction of PLDs with erythrocytes has been extensively studied due to the prominent hemolysis caused by these toxins. In this case, two different mechanisms of interactions with the erythrocytes have been proposed to explain the hemolytic effect [19,20,28,33].

Along with erythrocytes, platelets represent another cellular target for the PLDs, since these toxins can induce remarkable platelet aggregation [22,25,26,34-36]. This event is related to thrombocytopenia and thrombosis observed in the envenoming [37] that may aggravate the dermonecrosis caused by the PLDs [38]. Although it is hypothesized that platelet aggregation is a result of bioactive lipids released by the action of the PLDs [29], there are some indications that the plasma components are needed for platelet aggregation [23,25,26,34]. Hence, the role of PLDs on platelet aggregation still demands an investigation.

In this study, to better understand the relationship between the PLDs and platelets, we fused the recombinant PLD LgRec1 from *L. gaucho* with the enhanced green fluorescent protein (EGFP). This chimeric toxin, called EGFP-LgRec1, was then used as a fluorescence detector. Our results indicated that the fusion of EGFP to LgRec1 did not show interference with the main biological activities of this toxin such as platelet aggregation, hemolytic and sphingomyelinase activities. In addition, this chimera allowed to demonstrate and quantify the binding of LgRec1 to platelets through methodologies such as fluorescence activated cell sorter (FACS) and confocal microscopy. Therefore, this work shows the first evidence that a *Loxosceles* PLD binds to platelets triggering the exposure of phosphatidylserine (PS) and consequently promoting their aggregation.

2. Results

2.1. Cloning, Expression, and Purification of Phospholipase D (LgRec1) Fused to EGFP

The sequence of LgRec1 was cloned at 3' portion of the EGFP sequence in such a manner that after expression, LgRec1 would be located at the C-terminus of EGFP. The construction was transformed into BL21 Star™ (DE3) chemically competent cells, and after expression, the soluble fraction of cell lysates was subjected to Ni²⁺ affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE. A single band around 60 kDa was observed in the purified fraction (Figure 1A). The mass spectrometry analysis showed that the chimeric protein, named EGFP-LgRec1, presented a molecular mass of 59.880 Da (Figure 1B), which correspond to the mass of EGFP with 6xHis tag (28.3 kDa) and LgRec1 (31.7 kDa). Further analysis by western blot using anti-LgRec1 polyclonal antibodies showed the recognition of a single band for the induced and purified EGFP-LgRec1 as well as for the purified recombinant LgRec1 that was used as a positive control (Figure 1C). The average yield of soluble EGFP-LgRec1 was 20 mg per liter of culture.

Figure 1. Expression analysis of the chimeric toxin EGFP-LgRec1 (A) SDS-PAGE of recombinant EGFP-LgRec1 expression. EGFP-LgRec1 was overexpressed in *E. coli* BL21 Star(DE3) using pAZ vector and IPTG induction (1 mM) overnight at 20 °C. Proteins were visualized on a 12.5 % SDS/polyacrylamide gel under reduction conditions and stained with Coomassie blue. (B) MALDI-TOF MS analysis of purified EGFP-LgRec1. The spectra were acquired in positive ion linear mode, using the default calibration of the instrument. (C) Western blot analysis. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane, and incubated individually with anti-LgRec1 serum. M: protein molecular weight markers; 1 and 2: extract from BL21 Star™ (DE3) cells without and with IPTG induction, respectively; 3: purified/dialyzed EGFP-LgRec1; 4: purified/dialyzed LgRec1.

2.2. Biological Characterization of the Chimeric Toxin EGFP-LgRec1

Since LgRec1 can induce hemolysis and sphingomyelin hydrolysis [26], it was investigated if these activities were not impaired due to its fusion to the EGFP. It is known that the PLDs can induce hemolysis in the presence [19] or absence of serum [20], which we called indirect and direct hemolysis, respectively. Therefore, both situations were tested for EGFP-LgRec1, LgRec1, and EGFP (used as a negative control). As the results show, when tested in the presence of serum (Figure 2A), both toxins could promote hemolysis in 4 hours, while in its absence, the hemolysis was prominent only after 12 h (Figure 2B). In each situation, both EGFP-LgRec1 and LgRec1 exhibited similar results. The sphingomyelinase activity, evaluated with the Amplex-

Red Sphingomyelinase Assay Kit, also showed that both EGFP-LgRec1 and LgRec1 displayed similar concentration-dependent activity. Taken together, the results indicate that EGFP fusion did not interfere with the main biological activities of LgRec1.

Figure 2. Biological characterization of the recombinant chimeric toxin EGFP-LgRec1. Comparative direct (A) and indirect (B) hemolytic activity induced by LgRec1, EGFP or EGFP-LgRec1. Indirect hemolytic activity was evaluated in washed erythrocytes after 4 hours in the presence of human serum, while direct hemolytic activity was evaluated after 12 hours in the absence of serum with 1 mM of Ca^{2+} . In both situations, erythrocytes were incubated with different proteins concentration (0.75, 0.375 and 0.187 μM). Values given are the mean $\pm$ SEM ($n=6$) * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs LgRec1. (C) Comparative sphingomyelinase activity of EGFP-LgRec1, LgRec1 and EGFP evaluated by Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit at 37 °C for 30 min and fluorescence intensity was measured in a microplate reader using excitation at 540 nm and emission at 590 nm. Reactions used 0.15, 0.05, 0.0016 and 0.005 μM of each recombinant protein. Results were expressed as mean $\pm$ SEM ($n=3$) *** $p < 0.001$ vs LgRec1.

2.3. EGFP-LgRec1 Promotes Platelet Aggregation and Binding in Human Platelet-Rich Plasma

One remarkable characteristic of LgRec1 is its ability to promote platelet aggregation *in vitro* when incubated with human platelet-rich plasma (PRP) [26]. Then, LgRec1, EGFP-LgRec1, or EGFP were incubated with human PRP and their ability to promote platelet aggregation was evaluated. The results showed that both LgRec1 and EGFP-LgRec1 exhibited maximal platelet aggregation after 6 minutes (Figure 3A). Next, it was analyzed if the aggregation promoted by EGFP-LgRec1 could be related to its binding to the platelets. For this, the platelet aggregates clumps were extensively washed and analyzed by confocal microscopy. Since LgRec1 could cause platelet membrane modifications that might allow unspecific binding of the EGFP, the LgRec1 plus EGFP in equimolar concentration was used as a control. In this experiment, the EGFP was not used as a control because it does not induce platelet aggregation, as previously observed. As shown in Figure 3B, while EGFP-LgRec1 could induce platelet aggregation and show fluorescence, LgRec1 plus EGFP only caused platelet aggregation. These results show that LgRec1 binds to platelets and promotes their aggregation in the presence of plasma components.

Figure 3. Platelet aggregation of human platelet rich plasma (PRP) treated with the recombinant EGFP-LgRec1 and confocal microscopy images analysis. (A) Platelet aggregation assay. Comparative platelet aggregation induced by EGFP-LgRec1 and LgRec1. Platelet-rich plasma was incubated with 0.3 μ M of LgRec1, EGFP-LgRec1, and EGFP (negative control), respectively. Aggregation was monitored by measuring the light transmittance for 7 minutes by an aggregometer. Values given are the mean $\pm$ SEM (n= 3) *p < 0.05 and ***p < 0.001 vs LgRec1. (B) Confocal microscopy images analysis. PRP was incubated with 4 μ M of the chimeric toxin EGFP-LgRec1 or with LgRec1 plus EGFP for 2 h at 37 $^{\circ}$ C and analyzed by confocal microscopy. (I) fluorescence image (II) differential interference contrast image, (III) overlay of the left and middle images. Scale bars (10 μ m) are shown at the bottom right of the images.

2.4. EGFP-LgRec1 Binds to Platelets in the Absence of Plasma Components

Previous studies have shown that LgRec1 [26] and other *Loxosceles* phospholipases D can't cause platelet aggregation if plasma components are absent [23-25]. For this reason, it was investigated if the binding of EGFP-LgRec1 to the platelets could be affected in the lack of these components. To this end, human platelets were washed, fixed, and treated with the chimera EGFP-LgRec1, LgRec1 plus EGFP, and EGFP. As shown in Figure 4A, the washed platelets treated with EGFP-LgRec1 showed fluorescence, while those treated with both controls did not. To quantify the percentage of washed platelets labeled with EGFP-LgRec1, they were submitted to flow cytometry analysis (Figure 4B). The results showed that EGFP-LgRec1 bound to ~70% of the washed platelets. Thus, these results show that LgRec1 does not require plasma components to bind to platelets, although these elements are necessary to LgRec1 induce platelet aggregation.

Figure 4. Binding of recombinant EGFP-LgRec1 to human washed platelets. (A) Laser scanning confocal microscopy images of fixed human washed platelets. Washed platelets were fixed and incubated with 4 μ M of the chimeric toxin EGFP-LgRec1, LgRec1 plus EGFP or EGFP for 2 h at 37 °C. (I) fluorescence image (II) differential interference contrast (DIC) image, (III) overlay of the left and middle images. Scale bars (10 μ m) are shown at the bottom right of the images. (B) Flow cytometry analysis of washed platelets. Washed platelets incubated with 4 μ M of EGFP-LgRec1, LgRec1 plus EGFP or EGFP for 2 h at 37 °C. Positive labeled cells were defined as those with a fluorescence intensity above of the untreated platelets. The filled histograms represent the cells labeled with EGFP-LgRec1, LgRec1 plus EGFP or EGFP; the empty histograms represent the same cell suspension untreated. Percentages of labeled platelets after treatment

are indicated on the horizontal bar. The samples were performed in duplicate and are representative of three different experiments.

2.5. EGFP-LgRec1 Induce Exposure of Annexin V-Binding Sites in Platelets

There are many pieces of evidence indicating that erythrocytes treated with PLDs promoted the exposure of phosphatidylserine (PS) on the surface of these cells [20,33]. Considering that when platelets are activated, PS is also exposed on the cell surface to form a scaffold for coagulation factors [39], we investigated the activity of LgRec1 on the lipid reorganization on the platelet membrane. For this purpose, washed platelets were treated with recombinant toxin and incubated with annexin-V, which binds in a calcium-dependent and reversible manner to PS-expressing membranes [40]. As indicated by Figure 5A, ~90% of platelets were positive for annexin-V when preincubated with LgRec1 or LgRec1 plus EGFP, while EGFP showed just only a minor binding, probably due to platelet manipulation during the washing process. Hence, this finding suggests that LgRec1 promoted a reorganization of lipid components on platelet membrane with the exposure of PS. Also, as the process of PS flipping from the inner to the outer leaflet of the platelet membrane is present in cells undergoing apoptosis [39], we evaluated if LgRec1 or EGFP-LgRec1 promote damage to the platelets. To this end, we measured the level of lactate dehydrogenase (LDH), which is released when plasmatic membrane damage occurs. The results indicated similar levels of LDH in the supernatant of platelets incubated with the toxins or EGFP, indicating that LgRec1 does not cause platelet lysis during the time this toxin induce platelet aggregation (~10 min).

Figure 5. Binding of annexin-V to platelets treated with the EGFP-LgRec1 or LgRec1 and its effect on lactate dehydrogenase (LDH) leakage. (A) Flow cytometry analysis of platelets. Platelets were treated with 4 μ M of EGFP, LgRec1 plus EGFP or the chimeric toxin EGFP-LgRec1 for 2 h and 45min at 37 °C, then incubated for 15 min at RT (25 °C) in the dark with annexin V. Platelets were separated from debris based on the forward- and side- scatter profiles (data not shown). Percentage of labeled platelets obtained after treatment are indicated by horizontal bars; staining positive were defined as those with a fluorescence intensity above of the untreated platelets. The filled and empty histograms represent treated and untreated cells, respectively. The example is representative of three different experiments, each (n= 2). (B) LDH release by washed platelets. Washed platelets were incubated with 4 μ M of EGFP, LgRec1 or EGFP-LgRec1 and LDH leakage was evaluated by LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical) at 37 °C for 30 min, and absorbance was measured at 490 nm. Basal levels were assayed in untreated washed platelets, and Triton X-100 was used as maximum cytotoxicity control. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n= 3).

3. Discussion

The *Loxosceles* PLDs comprise a family of toxins that have amino acids and biological similarities [13,41] and studies using purified recombinant PLDs isoforms from different *Loxosceles* species have shown that they can promote dermonecrosis, deregulated inflammatory responses, hemolysis, platelet aggregation, increased vascular permeability, and acute renal failure [15,16,20,25,26]. Despite the indication that many of these biological activities are somehow related to the phospholipid metabolites generated by the PLDs through their action on the cell membrane, the mechanism of action of these toxins are not yet completely understood. For instance, it has shown that the lysis of erythrocytes induced by a PLD from *L. laeta* venom is dependent on activation of the complement system by the alternative pathway [10], which is triggered by the cleavage of cell surface glycoporphins by an unknown endogenous membrane-bound metalloproteinase [19,33]. On the other hand, some studies support a direct involvement of a PLD from *L. intermedia* in the hemolytic activity. In this case, the authors postulate that the PLD hydrolyze sphingomyelin from the erythrocytes membrane generating ceramide 1-phosphate that in turn would stimulate structural changes of the cytoplasmic membrane causing Ca^{2+} influx and, consequently, hemolysis [20,28]. Thus, it is reasonable to think that these two events together may represent a cooperation to increase the efficiency of these toxins.

Although the mechanism of *Loxosceles* PLDs on hemolysis are being studied in more detail, so far, no studies were conducted to identify the interaction of these toxins with platelets, even though they promote strong platelet aggregation *in vitro* and thrombus formation in rabbits [25]. In addition to that, it has been suggested a correlation with depletion of platelet and the dermonecrotic lesion development induced by *L. gaucho* venom [38] and thrombocytopenia in humans [2,42]. So, in this report, we explored the possibility of using a recombinant PLD

LgRec1 from *L. gaucho* [26] fused to the EGFP as a probe to detect the interaction of LgRec1 to platelets. The EGFP was chosen because its single excitation peak at 510 nm adapts perfectly to standard fluorescein isothiocyanate (FITC) filter sets, which makes it ideal to be used as an auto-fluorescent marker in the fluorescence activated cell sorting (FACS) and in the laser scanning confocal microscope (LSCM) [43]. Therefore, using these technologies, the interaction of LgRec1 with cells could be easily and rapidly analyzed.

To perform the construction of the chimera toxin, the LgRec1 was fused at the C-terminus of EGFP because this portion is flexible and rarely requires a linker to provide flexibility between the EGFP and the protein of interest [44]. The EGFP-LgRec1 was successfully expressed in bacteria, and mass spectrometry analysis showed the right mass for this construction, indicating that no premature termination occurred. In agreement with previous studies on PLDs, both LgRec1 and EGFP-LgRec1 showed a faster hemolytic activity in the presence of serum when compared without it, indicating the importance of serum components in the erythrocytes hemolysis [19]. In addition, EGFP-LgRec1 exhibited preserved sphingomyelinase and platelet aggregation activities, pointing out that the relatively large EGFP (~ 27 kDa) did not interfere with the main biological activities of LgRec1.

The first clinical and experimental studies on platelets using *Loxosceles* PLDs was performed by Denny and colleagues in 1964 [45], suggesting that toxins present in the *L. reclusa* venom could promote platelet activation. Later, in 1981 another group [22] using a purified PLD from this venom, demonstrated a non-lytic effect on platelets with aggregation and serotonin release. Subsequently, using platelets separated from plasma proteins, Rees and colleagues in 1988 [34] showed for the first time that a purified PLD from *L. reclusa* required a plasma component(s) to promote platelet aggregation. In this study, the plasma component, C-reactive protein (CRP), was implicated as a co-factor required for platelet aggregation. However, in another study, the same group established that serum amyloid P component (SAP), not CRP, is most likely the protein required by the toxin to activate human platelets *in vitro*. The authors claimed that the previous results observed with CRP were probably due to contamination with SAP [23,46]. However, so far, no other study has confirmed this observation, although it has been shown that PLDs require plasma components to induce platelet aggregation [25,26]. Another possible explanation for platelet aggregation caused by PLDs is that these toxins can produce lysophosphatidic acid (LPA) [30,31], which is capable of inducing platelet activation and aggregation through the stimulation of LPA₁ and LPA₃ receptors [47]. However, experiments using dioctanoylglycerol pyrophosphate, a selective antagonist of LPA₁ and LPA₃ receptors, failed to prevent platelet aggregation induced by *L. gaucho* whole venom [25]. Consequently, the mechanism by which PLDs induce platelet aggregation requires more investigation.

As the EGFP-LgRec1 showed to be fully active, it was tested if it could induce platelet aggregation in human platelet-rich plasma (PRP) and if this activity was related to the binding of LgRec1 to its membrane. The results showed that EGFP-LgRec1 promoted platelet aggregation in human PRP in a similar way as LgRec1 and the aggregates treated with EGFP-LgRec1 exhibited a strong fluorescence, with no signal detected in the controls. Also, to investigate if EGFP-LgRec1 could bind to platelets in the absence of plasma components, the EGFP-LgRec1 was incubated with washed platelets. The confocal analysis showed that only platelets treated with EGFP-LgRec1 exhibited fluorescence, indicating that although LgRec1 requires plasma components to promote platelet aggregation, these components are not necessary for the binding of this toxin. Further analysis by FACS, revealed that about 70% of the platelets were tagged by EGFP-LgRec1.

Previous experiments with the PLDs from *L. laeta* [33] and *L. intermedia* [20] have shown the exposure of phosphatidylserine (PS) on the erythrocytes membrane after toxin treatment.

This event was associated with the formation of ceramide resulting from PLDs activity on the sphingomyelin present on the erythrocyte membrane [20], since the increment of ceramide levels, along with increased cytosolic Ca^{2+} , can lead to membrane scrambling and subsequent PS exposure [48,49]. In platelets, PS exposure leads to a procoagulant phenotype [50], a process also regulated by intracellular Ca^{2+} , suggesting the involvement of calcium-activated phospholipid scramblases [39,51].

The flow cytometry analysis showed that washed platelets treated with the PLD LgRec1 were positive for the binding of annexin-V, indicating the presence of PS. Our results also indicated that this flipping of PS on platelets caused by LgRec1 did not promote damage to the platelets membrane in the time necessary for this toxin induce platelet aggregation since no leakage of LDH was detected. As PS exposure on the surface of activated platelets is essential for the membrane assembly of coagulation factor complexes necessary for thrombin generation and fibrin formation [52], this might explain the induction of platelet aggregation by PLDs in the presence of plasma components. However, if the PS flipping to the outer leaflet of the platelet membrane is caused by ceramide due to the action of LgRec1 on platelet membrane and if this exposure alone is sufficient to support platelet aggregation, independent of other events, it is still under investigation by our group. In addition, although PLDs can hydrolyze sphingomyelin and/or lysophospholipids, this fact not necessarily means that PLDs bind to these molecules on the surface of cell membrane. Thus, the identity of the targets of LgRec1, as well as other PLDs, remain to be defined. In this way, the chimera EGFP-LgRec1 could be a useful marker to help in the identification of these targets and clarify the mechanisms of PS flipping on the cell membrane. In addition, the EGFP-LgRec1 may be useful to easily detect its binding/unbinding on tests to find specific inhibitors with the purpose of minimizing its role on aggregation.

4. Conclusions

In this work, we describe the use of EGFP fused to the recombinant PLD LgRec1 from *L. gaucho* venom as a probe to show the first evidence of attachment of this toxin to platelets. The data indicate that while this toxin requires plasma components to promote platelet aggregation, these components are not necessary for the binding of LgRec1 to platelets. In addition, the attachment of LgRec1 to human platelets cell membrane suggests the exposure of PS that may act as a scaffold for coagulation factors, thus explaining the requirement of plasma components to promote platelet aggregation.

5. Materials and Methods

5.1. Ethics

All manipulation of microorganisms was approved by CTNBio (n° 2949/2011). All procedures involving human blood were approved by São Paulo Health Institute - Ethical Committee for Human Protocol: 019/2008/SES/IS/CEPIS.

5.2. Cloning, Expression, and Purification of EGFP-LgRec1

To construct the chimera EGFP-LgRec1, the sequence of LgRec1 was extracted from pAE-LgRec1 vector [26] with the help of restriction enzymes *Bam*HI and *Hind*III, then subcloned into the pAZ vector, which contains an EGFP sequence [53], previously digested with the same restriction enzymes. The sequence of EGFP was positioned at the 5' portion of LgRec1, and the resulting vector was named pAZ-EGFP-LgRec1.

Chemically competent *E. coli* BL21 Star™(DE3) pLysS (Thermo Fisher Scientific Scientific, Waltham, MA, USA) cells were transformed with pAZ-EGFP-LgRec1 construction and plated on LB-agarose plates containing 100 µg/mL ampicillin and 34 mg/mL chloramphenicol and grown overnight at 37 °C. Next day, a single colony was then inoculated into LB broth (containing 100 µg/mL ampicillin and 34 mg/mL chloramphenicol) and grown overnight at 30 °C. The overnight culture was then used to inoculate 250 mL of fresh LB (ampicillin) medium at 1:50 dilution. At an optical density (600 nm) of 0.6, isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM to induce the recombinant protein expression. The culture was maintained overnight at 20 °C before the cells were harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min at 4 °C. Cells were resuspended in binding buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.0) and intermittently sonicated. Cell debris was removed from the protein solution by centrifugation at 10,000 g for 10 min.

The supernatant containing the soluble proteins was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using Ni²⁺ Sepharose® 6 Fast Flow GE® (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) following the manufacturer's recommendations. The protein was dialyzed against TBS-Glycerol (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Glycerol, pH 7.4). Quantification of recombinant toxins was performed using the BCA Pierce™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's protocol. The LgRec1 and EGFP were expressed and purified as previously described [26,53].

5.3. Determination of Molecular Mass by Mass Spectrometry

This procedure was carried out by the Center for Research Support (CEFAP) of the Institute of Biomedical Sciences (ICB) of the University of São Paulo (USP). Analyses were performed on the MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) equipment following pre-established protocols for protein analysis. The procedure consisted in the application of 0.5 µL of a saturated solution of sinapinic acid in ethanol, on the sample of EGFP-LgRec1. After drying, 1 µL of EGFP-LgRec1 was mixed with 1 µL of a TA30 saturated solution (0.1% trifluoroacetic acid /acetonitrile, 70:30) and finally, 1 µL was applied to the Ground Steel plate for analysis. Data acquisition was performed in linear mode with positive polarity, with the following parameters: Ion Source 1 - 19.50 kV, Ion Source 2 - 17.60 kV, Lens - 9.0 kV, Pulsed Ion Extraction 170 ns, Mass Range 5 - 70 kDa, Laser Frequency 500 Hz, Gain Detector 10.0 x. The results were analyzed using the online software mMass version 5.5.0, 2013, (Martin Strohmalm© Open Source Mass Spectrometry Tool, www.mmass.org).

5.4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blot Analysis

Samples of the recombinant proteins or bacterial extract culture before and after IPTG induction were analyzed by SDS-PAGE 12.5% under reducing conditions (2.5% dithiothreitol). After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie Blue R-250 or transferred onto nitrocellulose membranes using the Trans-Blot® turbo™ transfer system (BioRad®) following the manufacturer's recommendations. After transfer, the nitrocellulose membranes were stained with Ponceau S (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) at 1:20 dilution to verify the transfer efficiency. To remove the dye, the membranes were washed with TBS-Tween (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) until complete removal. The membranes were incubated for 2 h with rabbit polyclonal anti-LgRec1 antibody at 1:8000 dilution. Membranes were washed with TBS-Tween and immunoreactive proteins were detected using 1:1000 diluted peroxidase labeled anti-rabbit IgG (Sigma Life Science), and the blot revealed with 4-chloro-1-naphthol. To infer the molecular mass, the following standards were used: Full-

range Amersham Rainbow Marker (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.5. Sphingomyelinase Assay

Sphingomyelinase activity was measured by Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). This assay specifically monitors PLD activity by using choline oxidase to oxidize free choline released after cleavage of the phosphodiester bond of sphingomyelin. Released hydrogen peroxide binds to Amplex™ Red resulting in a fluorescent molecule (resorufin). The chimeric toxin EGFP-LgRec1, LgRec1 with EGFP or EGFP (0.15, 0.05, 0.016 and 0.005 μ M) were added to the Amplex Red reagent mixture and the plate containing the samples (100 μ L) were incubated at 37 °C for 30 min before measuring fluorescence absorbance/emission at 540/590 nm in a spectrofluorometer Spectramax M2 (Molecular Devices LLC., Sunnyvale, CA, USA).

5.6. Blood Cells and Serum

Human blood was collected in a 3.8% sodium citrate solution (1:9), after informed consent, from healthy volunteers who declared not to have taken medications known to interfere with platelet function for the previous 10 days. Further steps were taken depending on the wanted cell, as following:

Platelet Rich Plasm (PRP): Citrated whole blood was centrifuged at 115 g for 30 minutes, and the supernatant was collected.

Washed platelets: Prostaglandin E1 (PGE1) was added to PRP and centrifuged at 1125 g for 15 minutes and the pellet was washed twice with wash buffer (60 mM NaCl, 2.7 mM NaHCO₃, 1.27 mM KCl, 0.45 mM Na₂HPO₄, 1.05 mM MgCl₂, 10.98 mM Na₃Citrate, 0.27 mM glucose, 26.33 mM BSA, pH 6.5). The washed pallet was then resuspended at Tyrode's solution (66.9 mM NaCl, 5.9 mM NaHCO₃, 1.47 mM KCl, 0.31 mM NaHPO₄, 1.05 mM MgCl₂, 0.63 mM CaCl₂, 4.99 mM Hepes, 22.7 mM glucose, pH 7.4).

Washed erythrocytes: Citrated whole blood was centrifuged at 800 g for 10 minutes, and the pellet was carefully washed with Tris-Sucrose buffer (10 mM Tris/HCl, 250 mM Sucrose; pH 7.4) and centrifuged 2000 g for 5 minutes, three times.

5.7. Platelet Aggregation Assay

Platelet aggregation in PRP and washed platelets was carried out as previously [26]. Platelet aggregation was monitored in a Chrono-log aggregometer, model 490 (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA), at 37 °C with a bar stirring speed set to 1000 rpm. The dose of 0.3 μ M of LgRec1, EGFP, and EGFP-LgRec1 was evaluated on platelet aggregation. The agonists ADP (final concentration, 10 μ M) was used as positive controls for platelet aggregation.

5.8. Determination of Hemolytic Activity

The tests were performed in six replicates, using 1×10^8 red cells in 100 μ L of diluted proteins (0.75; 0.375; 0.187 μ M) per well in 96-well U-bottom plates, as following: Indirect hemolytic activity: Washed erythrocytes were incubated with EGFP, LgRec1, or EGFP-LgRec1 (0.75, 0.375 and 0.187 μ M, each) for 4 hours at 37 °C. After that period, the erythrocytes were

incubated with 50 μ L of serum and the positive control incubated with 1% Triton X-100 for 1 h at 37 °C under agitation. Direct hemolytic activity: Washed erythrocytes were incubated with EGFP, LgRec1, or EGFP-LgRec1 (0.75, 0.375 and 0.187 μ M, each) in the presence of 1 mM of Ca^{2+} for 12 hours at 37 °C. After that period, the erythrocytes were incubated with 50 μ L of Tris-Sucrose and the positive control was done as above. After the incubation, the plate was centrifuged at 2000 g for 5 minutes and the supernatant read at 415 nm. The values were converted to percentage considering the 100% the hemolysis caused by Triton X-100. For the tests, serum and red cells from the same donor were used to prevent complement activation by recognition of antibodies by the ABO blood system.

5.9. Confocal Immunofluorescence

Washed platelets (4×10^8 platelets) were fixated in microscope slides using the Fixative Solution (Methanol 100%) from the HEMA 3® kit (Thermo Fisher Scientific Scientific, Waltham, MA, USA) and washed with water. The fixated platelets were incubated with 500 μ L of LgRec1 plus EGFP, EGFP, or EGFP-LgRec1 (4 μ M, each) in the microscope slides for 2 hours at 37 °C then washed 3 times with Tyrode's solution.

PRP (4×10^8 platelets) were incubated in aggregation condition with 500 μ L of LgRec1 plus EGFP, EGFP, or EGFP-LgRec1 (4 μ M, each) in tubes for 2 hours at 37 °C then washed 3 times with Tyrode's solution. Then, the platelet aggregate was transferred to microscope slides. Samples were then observed using a confocal fluorescence microscope (Confocal Radiance 2,100, BioRad, Hercules) coupled to a Nikon-Eclipse E800 with Plan-Apochromatic objective (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, USA).

5.10. Flow Cytometry

Chimeric protein binding experiments were performed on a flow cytometer (BD FACSCalibur System). Washed platelets (4×10^8 cells) were incubated with EGFP, LgRec1 plus EGFP or EGFP-LgRec1 (4 μ M, each) for 2 hours at 37 °C. Treated washed platelets were separated from debris based on the forward- and side- scatter profiles (data not shown). Staining positive were defined as those with a fluorescence intensity above of the untreated platelets. The percentage of EGFP positive cells were calculated using FlowJo software (FlowJo LLC). Data from 100,000 events were collected and analyzed. All samples were performed in duplicate and the results expressed as the percentage of EGFP positive cells calculated from untreated platelets.

5.11. Phosphatidylserine Exposure

To identify the exposure of phosphatidylserine (PS) annexin-V binding experiments were performed using the PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) in a flow cytometer (BD FACSCalibur System, Becton Dickinson). Washed platelets (4×10^8 cells) were incubated with EGFP, LgRec1 plus EGFP or EGFP-LgRec1 (4 μ M, each) for 1 hour and 45 minutes at 37 °C. PE-Annexin V was then added and incubated for 15 min at room temperature (25 °C) in the dark. Platelets were separated from debris based on the forward- and side- scatter profiles (data not shown). All samples were performed in duplicate (10^4 events per data

acquisition file). The data were analyzed using FlowJo software (FlowJo LLC), and the results expressed as the percentage of PE-Annexin V positive cells calculated from untreated platelets.

5.12. Lactate Dehydrogenase Leakage

The release of cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) to the supernatant of platelets was determined as a marker of cell membrane integrity. Washed platelets (4×10^8 cells/mL) were incubated with EGFP, LgRec1 plus EGFP, or EGFP-LgRec1 (4 μ M, each) for 15 minutes at 37 °C. Negative control and positive control cytolysis consisted of medium of untreated cells and medium from cells incubated with 0.1% (v/v) of Triton X-100, respectively. After incubation, cells were centrifuged at 10,000 g for 15 min. The supernatant was used to determine the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from platelets using the LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical) following the manufacturer's protocol.

5.13. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) with the posttest Bonferroni test in the GraphPad Prism 5 software version 5.01, 2007. (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Significance was considered when $p \leq 0.05$.

Acknowledgments: This work has received financial support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo grant 2014/23457-9), and CAPES (grant 1216/2011—Edital63/2010—Toxinologia). We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grant to Eliana L. Faquim-Mauro (309392/2015-2). We thank Alexsander Seixas de Souza for his assistance in the use of the Confocal Laboratory of Parasitology FAPESP 00/11624-5 and Dr. Jorge Mário da Costa Ferreira Jr., Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brazil, for flow cytometry acquisition and analysis.

Author Contributions: All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in the *Toxins*. The authors Geraldo Magalhães and Daniel Akio Fukuda conceived, designed the experiments and wrote the paper; Daniel Akio Fukuda and Maria Caporrino performed the experiments; Geraldo Magalhães and Katia Barbaro contributed reagents/materials/analysis tools; Katia Barbaro, Maisa Della-Casa and Eliana L. Faquim-Mauro helped in the revising the manuscript critically for important intellectual content and data analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Pezzi, M.; Giglio, A.M.; Scozzafava, A.; Filippelli, O.; Serafino, G.; Verre, M. Spider bite: A rare case of acute necrotic arachnidism with rapid and fatal evolution. *Case Rep Emerg Med* **2016**, *7*, 640789.
2. Malaque, C.M.; Santoro, M.L.; Cardoso, J.L.; Conde, M.R.; Novaes, C.T.; Risk, J.Y.; França, F.O.; de Medeiros, C.R.; Fan, H.W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon* **2011**, *58*, 664–671.

3. Cordeiro, F.A.; Amorim, F.G.; Anjolette, F.A.; Arantes, E.C. Arachnids of medical importance in Brazil: Main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* **2015**, *21*, 24.
4. Saúde, M. Sistema de informação agravos de notificação (sinan). 2016.
5. Veiga, S.S.; da Silveira, R.B.; Dreyfus, 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.
6. 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.
7. da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom are endo-beta-n-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* **2007**, *49*, 758-768.
8. de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Araújo, S.C.; Gabriel, d.M.; 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.
9. 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.
10. Tambourgi, D.; Magnoli, F.; van den Berg, C.; Morgan, B.; de Araujo, P.; Alves, E.; Da Silva, W. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *251*, 366-373.
11. Cunha, R.B.; Barbaro, K.C.; Muramatsu, D.; Portaro, F.C.; Fontes, W.; de Sousa, M.V. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucha* brown spider venom. *J Protein Chem* **2003**, *22*, 135-146.
12. Barbaro, K.C.; Knysak, I.; Martins, R.; Hogan, C.; Winkel, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* **2005**, *45*, 489-499.
13. 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**, *6*, 2403-2416.
14. Fernandes-Pedrosa, M.e.F.; Junqueira-de-Azevedo, I.e.L.; Gonçalves-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 Genomics* **2008**, *9*, 279.
15. Paludo, K.S.; Biscaia, S.M.; Chaim, O.M.; Otuki, M.F.; Naliwaiko, K.; Dombrowski, P.A.; Franco, C.R.; Veiga, S.S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **2009**, *149*, 323-333.
16. 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.
17. Tambourgi, D.; Paixao-Cavalcante, D.; de Andrade, R.; Fernandes-Pedrosa, M.; Magnoli, F.; Morgan, B.; van den Berg, C. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *Journal of Investigative Dermatology* **2005**, *124*, 725-731.

18. Chaim, O.; da Silveira, R.; Trevisan-Silva, D.; Ferrer, V.; Sade, Y.; Boia-Ferreira, M.; Gremski, L.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Takahashi, H., *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-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, 1811, 84-96.
19. Tambourgi, D.V.; Morgan, B.P.; de Andrade, R.M.; Magnoli, F.C.; van Den Berg, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood* **2000**, 95, 683-691.
20. 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.
21. Fernandes Pedrosa, M.e.F.; Junqueira de Azevedo, I.e.L.; Gonçalves-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.
22. Kurpiewski, G.; Forrester, L.J.; Barrett, J.T.; Campbell, B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim Biophys Acta* **1981**, 678, 467-476.
23. Gates, C.A.; Rees, R.S. Serum amyloid P component: Its role in platelet activation stimulated by sphingomyelinase d purified from the venom of the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). *Toxicon* **1990**, 28, 1303-1315.
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.
25. Tavares, F.L.; Peichoto, M.E.; Rangel, D.e.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.
26. Magalhães, G.S.; Caporrino, M.C.; Della-Casa, M.S.; Kimura, L.F.; Prezotto-Neto, J.P.; Fukuda, D.A.; Portes-Junior, J.A.; Neves-Ferreira, A.G.; Santoro, M.L.; Barbaro, K.C. Cloning, expression and characterization of a phospholipase d from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie* **2013**, 95, 1773-1783.
27. Chaves-Moreira, D.; Senff-Ribeiro, A.; Wille, A.C.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* **2017**, 23, 6.
28. 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.
29. 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.
30. Lee, S.; Lynch, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J* **2005**, 391, 317-323.
31. van Meeteren, L.; Frederiks, F.; Giepmans, B.; Pedrosa, M.; Billington, S.; Jost, B.; Tambourgi, D.; Moolenaar, W. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 10833-10836.

32. 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.
33. Tambourgi, D.; Da Silva, M.; Billington, S.; De Andrade, R.; Magnoli, F.; Songer, J.; Van den Berg, C. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* **2002**, *107*, 93-101.
34. Rees, R.S.; Gates, C.; Timmons, S.; Des Prez, R.M.; King, L.E. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* **1988**, *26*, 1035-1045.
35. 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.
36. Appel, M.H.; da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Paludo, K.S.; Silva, D.T.; Chaves, D.M.; da Silva, P.H.; Mangili, O.C.; Senff-Ribeiro, A.; Gremski, W., *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.
37. Tavares, F.L.; Sousa-e-Silva, M.C.; Santoro, M.L.; Barbaro, K.C.; Rebecchi, I.M.; Sano-Martins, I.S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Hum Exp Toxicol* **2004**, *23*, 477-486.
38. Tavares, F.L.; Peichoto, M.E.; Marcelino, J.R.; Barbaro, K.C.; Cirillo, M.C.; Santoro, M.L.; Sano-Martins, I.S. Platelet participation in the pathogenesis of dermonecrosis induced by *Loxosceles gaucho* venom. *Hum Exp Toxicol* **2016**, *35*, 666-676.
39. Bevers, E.M.; Williamson, P.L. Getting to the outer leaflet: Physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol Rev* **2016**, *96*, 605-645.
40. van Genderen, H.O.; Kenis, H.; Hofstra, L.; Narula, J.; Reutelingsperger, C.P. Extracellular annexin a5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1783*, 953-963.
41. Ribeiro, R.; Chaim, O.; da Silveira, R.; Gremski, L.; Sade, Y.; Paludo, K.; Senff-Ribeiro, A.; de Moura, J.; Chavez-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.
42. Levin, C.; Bonstein, L.; Lauterbach, R.; Mader, R.; Rozemman, D.; Koren, A. Immune-mediated mechanism for thrombocytopenia after *Loxosceles* spider bite. *Pediatr Blood Cancer* **2014**, *61*, 1466-1468.
43. Xia, Z.; Ye, H.; Locklin, R.M.; Ferguson, D.J.; Cui, Z.; Triffitt, J.T. Efficient characterisation of human cell-bioceramic interactions in vitro and in vivo by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5790-5800.
44. Miyawaki, A.; Sawano, A.; Kogure, T. Lighting up cells: Labelling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol* **2003**, *Suppl*, S1-7.
45. Denny, W.F.; Dillaha, C.J.; Morgan, P.N. Hemotoxic effect of *Loxosceles reclusa* venom: *In vivo* and *in vitro* studies. *J Lab Clin Med* **1964**, *64*, 291-298.
46. Rees, R.S. Platelet activation stimulated by the toxin of the brown recluse spider requires serum amyloid P component, not c-reactive protein. *Toxicon* **1989**, *27*, 953-954.
47. Rother, E.; Brandl, R.; Baker, D.L.; Goyal, P.; Gebhard, H.; Tigyi, G.; Siess, W. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* **2003**, *108*, 741-747.

48. Lang, F.; Huber, S.M.; Szabo, I.; Gulbins, E. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *Arch Biochem Biophys* **2007**, *462*, 189-194.
49. Mitsutake, S.; Igarashi, Y. Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *359*, 622-627.
50. Schoenwaelder, S.M.; Yuan, Y.; Josefsson, E.C.; White, M.J.; Yao, Y.; Mason, K.D.; O'Reilly, L.A.; Henley, K.J.; Ono, A.; Hsiao, S., *et al.* Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood* **2009**, *114*, 663-666.
51. Heemskerk, J.W.; Mattheij, N.J.; Cosemans, J.M. Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. *J Thromb Haemost* **2013**, *11*, 2-16.
52. Heemskerk, J.W.; Bevers, E.M.; Lindhout, T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* **2002**, *88*, 186-193.
53. Butera, D.; Piazza, R.M.; McLane, M.A.; Chammass, R.; da Silva, A.M. Molecular engineering of an egfp/disintegrin-based integrin marker. *Toxicon* **2005**, *46*, 178-184.

© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5 CONCLUSÕES

Neste estudo, para melhor compreender a relação entre as FLDs e as plaquetas, fusionamos a FLD recombinante LgRec1 de *L. gaucho* com a proteína fluorescente verde aumentada (EGFP). Esta toxina quimérica, denominada EGFP-LgRec1, foi então utilizada como detector de fluorescência. Nossos resultados indicaram que a fusão de EGFP com LgRec1 não mostrou interferência com as principais atividades biológicas desta toxina, tais como agregação de plaquetas, atividades hemolíticas e esfingomielinase. Além disso, esta quimera permitiu demonstrar e quantificar a ligação de LgRec1 a plaquetas através de metodologias tais como triagem de células ativadas por fluorescência (FACS) e microscopia confocal. O uso de Annexina-V marcada mostrou que a ação da LgRec1 leva à exposição de fosfatidilserina mas esta exposição não está relacionada à morte celular, fato comprovado através da ausência de vazamento de lactato desidrogenase (LDH). Portanto, este trabalho mostra a primeira evidência de que uma FLD de *Loxosceles* se liga a plaquetas que desencadeia a exposição de fosfatidilserina e consequentemente promovendo sua agregação.

REFERENCIAS*

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

BAKRAC, B., A. et al. A toxin-based probe reveals cytoplasmic exposure of Golgi sphingomyelin. **J Biol Chem** v. 285 n. 29, p. 22186-22195, 2010.

BARBARO, K. C. et al. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon**, v. 32, n.1, p. 113-120, 1994.

BARBARO, K. C. et al. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **J Protein Chem**, v. 15, n. 4, p. 337-343, 1996.

BARBARO, K. C. et al. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 489-499, 2005.

BARRETT, S. M. et al. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. **Clin Chem**, v. 39, n. 10, p. 2104-2107, 1993.

BUTERA, D. et al. Molecular engineering of an EGFP/disintegrin-based integrin marker. **Toxicon**, v. 46, n. 2, p. 178-184, 2005.

CARDOSO, D.F.; YAMAGUCHI, I.K.; MOURA-DA-SILVA; A.M. Produção de soros e antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In J.L.C Cardoso et al. (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**, 2003, Savier, São Paulo. p. 367-379.

CATALÁN, A. et al. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 25, n. 6, p. 393-403, 2011.

CHAIM, O. M. et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 1, p. 64-77, 2006.

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

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHAIM, O. M. et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins** (Basel), v. 3, n. 3, p. 309-344, 2011b.

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. **J Cell Biochem**, n.107, v. 4, p. 655-666, 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. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 9, p. 2529-2540, 2011.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, n. 23, v. 6, p. 1-12, 2017.

CORMACK, B. P. et al. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, v. 173, v. 1 Spec No, p. 33-38, 1996.

CUNHA, R. B. et al. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. **J Protein Chem**, v. 22, n. 2, p. 135-146, 2003.

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

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

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

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

DE SANTI FERRARA, G. I. et al. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**, v. 53, n. 7-8, p. 743-753, 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. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 5, p. 1264-1266, 2007.

FERNANDES PEDROSA, M. e. F. et al. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, n. 5, p. 638-645, 2002.

FERNANDES-PEDROSA, M. e. F. et al. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, n. 279, 2008.

FERRER VP. **Clonagem e expressão heteróloga de hialuronidase e alérgeno presentes no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**, 2010. 20 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2010.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-267, 1992.

GATES, C. A.; R. S. REES. Serum amyloid P component: its role in platelet activation stimulated by sphingomyelinase D purified from the venom of the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v. 28, n. 11, p. 1303-1315, 1990.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 12, p. 2403-2416, 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, 2014.

GUILHERME, P. et al. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1333-1342, 2001.

HEIM, N.; GRIESBECK, O. Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. **J Biol Chem**, v. 279, n. 14, p. 14280-14286, 2004.

HEIM, R. et al. Improved green fluorescence. **Nature**, v. 373, n. 6516, p. 663-664, 1995.

KALAPOTHAKIS, E. et al. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1691-1699, 2002.

KOHLI, N. et al. Oral delivery of bioencapsulated proteins across blood-brain and blood-retinal barriers. **Mol Ther**, v. 22, n. 3, p. 535-546, 2014.

KURPIEWSKI, G. et al. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochim Biophys Acta**, v. 678, n. 3, p. 467-476, 1981.

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, 2008.

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

MAGALHÃES, G. S. et al. Engineered mammalian vector to express EGFP-tagged proteins as biomarkers. **Mol Biotechnol**, v. 51, n. 2, p. 119-127, 2012.

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

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

Ministério da Saúde. SINAM. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso em 18 de agosto de 2016.

MURAKAMI, M. T. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, n. 1, p. 323-329, 2006.

PALUDO, K. S. et al. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, n. 3, p. 323-333, 2009.

PRASHER, D. C. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, v. 111, n. 2, p. 229-233, 1992.

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

RAMOS-CERRILLO, B. et al. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 507-514, 2004.

REES, R. S. et al. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 1035-1045, 1988.

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

ROUX, S. et al. Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions." **Mol Cell Neurosci**, v. 30, n. 1, p. 79-89, 2005.

SHIMOMURA, O. et al. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **J Cell Comp Physiol**, v. 59, p. 223-239, 1962.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**, v. 24, n. 3, p. 213-221, 2006.

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

TAMBOURGI, D. V. et al. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis." **Blood**, v. 95, n. 2, p. 683-691, 2000.

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

TAMBOURGI, D. V. et al. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol Immunology**, v. 41, n. 8, p. 831-840, 2004.

TAMBOURGI, D. V. et al. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 4, p. 725-731, 2005.

TAMBOURGI, D. V. et al. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Mol Immunology**, v. 44, n. 4, p. 576-582, 2007.

TAVARES, F. L. et al. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Hum Exp Toxicol**, v. 23, n. 10, p. 477-486, 2004.

TAVARES, F. L. et al. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 10, p. 1567-1574, 2011.

TAVARES, F. L. et al. Platelet participation in the pathogenesis of dermonecrosis induced by *Loxosceles gaucho* venom. **Hum Exp Toxicol**, v. 35, n. 6, p. 666-676, 2016.

TOWBIN, H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 509-544, 1998.

VAN MEETEREN, L. et al. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem**, v. 279, n. 12, p. 10833-10836, 2004.

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

XIA, Z. et al. Efficient characterisation of human cell-bioceramic interactions *in vitro* and *in vivo* by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 29, p. 5790-5800, 2005.

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

ANEXO A: Autorização de uso do artigo "*Identification of direct binding of a Phospholipase D from Loxosceles gaucho to platelets*"

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

São Paulo, 29 de Maio de 2017

Por meio desta, autorizo o uso do manuscrito intitulado "Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* spider binds to platelets and promote phosphatidylserine exposure", na dissertação de mestrado do aluno Daniel Akio Fukuda intitulada "Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas". O aluno defenderá seu mestrado no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas). Este manuscrito foi escrito por Daniel A. Fukuda, Maria Cristina Caporrino, Katia Cristina Barbaro, Maisa Splendore Della-Casa, Eliana L. Faquim-Mauro e Geraldo S. Magalhães, e submetido a revista Toxins dia 27 de abril de 2017.

Maria Cristina Caporrino

Tel. (11) 2627-9779

e-mail: cristina.caporrino@butantan.gov.br

Av. Vital Brasil, 1500

05503-900 – São Paulo, SP

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

São Paulo, 29 de Maio de 2017

Por meio desta, autorizo o uso do manuscrito intitulado "Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* spider binds to platelets and promote phosphatidylserine exposure ", na dissertação de mestrado do aluno Daniel Akio Fukuda intitulada "Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas". O aluno defenderá seu mestrado no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas). Este manuscrito foi escrito por Daniel A. Fukuda, Maria Cristina Caporrino, Katia Cristina Barbaro, Maisa Splendore Della-Casa, Eliana L. Faquim-Mauro e Geraldo S. Magalhães, e submetido a revista Toxins dia 27 de abril de 2017.

Katia Cristina Barbaro

Tel. (11) 2627-9779

e-mail: katia.barbaro@butantan.gov.br

Av. Vital Brasil, 1500

05503-900 – São Paulo, SP

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

São Paulo, 29 de Maio de 2017

Por meio desta, autorizo o uso do manuscrito intitulado "Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* spider binds to platelets and promote phosphatidylserine exposure", na dissertação de mestrado do aluno Daniel Akio Fukuda intitulada "Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas". O aluno defenderá seu mestrado no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas). Este manuscrito foi escrito por Daniel A. Fukuda, Maria Cristina Caporrino, Katia Cristina Barbaro, Maisa Splendore Della-Casa, Eliana L. Faquim-Mauro e Geraldo S. Magalhães, e submetido a revista Toxins dia 27 de abril de 2017.

Maisa Splendore Della-Casa

Tel. (11) 2627-9779

e-mail: maisa.dellacasa@butantan.gov.br

Av. Vital Brasil, 1500

05503-900 – São Paulo, SP

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

São Paulo, 29 de Maio de 2017

Por meio desta, autorizo o uso do manuscrito intitulado "Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* spider binds to platelets and promote phosphatidylserine exposure", na dissertação de mestrado do aluno Daniel Akio Fukuda intitulada "Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas". O aluno defenderá seu mestrado no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas). Este manuscrito foi escrito por Daniel A. Fukuda, Maria Cristina Caporrino, Katia Cristina Barbaro, Maisa Splendore Della-Casa, Eliana L. Faquim-Mauro e Geraldo S. Magalhães, e submetido a revista Toxins dia 27 de abril de 2017.

Eliana L. Faquim-Mauro

Tel. (11) 2627-9779

e-mail: eliana.faquim@butantan.gov.br

Av. Vital Brasil, 1500

05503-900 – São Paulo, SP

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

São Paulo, 29 de Maio de 2017

Por meio desta, autorizo o uso do manuscrito intitulado "Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* spider binds to platelets and promote phosphatidylserine exposure", na dissertação de mestrado do aluno Daniel Akio Fukuda intitulada "Identificação da ligação direta de uma Fosfolipase D de *Loxosceles gaucho* às plaquetas". O aluno defenderá seu mestrado no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas). Este manuscrito foi escrito por Daniel A. Fukuda, Maria Cristina Caporrino, Katia Cristina Barbaro, Maisa Splendore Della-Casa, Eliana L. Faquim-Mauro e Geraldo S. Magalhães, e submetido a revista Toxins dia 27 de abril de 2017.

Geraldo Santana Magalhães

Tel. (11) 2627-9779

e-mail: geraldo.magalhaes@butantan.gov.br

Av. Vital Brasil, 1500

05503-900 – São Paulo, SP