ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO SORO ANTILOXOSCÉLICO DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE FOSFOLIPASES–D RECOMBINANTES INATIVAS

Amanda Terezinha Zanlorensi (PIBIC/UEPG), Ana Carolina Matins Wille
e-mail: anacarolina.wille@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEBIOGEM/SEBISA

Morfologia; Histologia.

Palavras-chave: Fosfolipases-D, TCTP, soro anti-loxoscélico.

Resumo

As aranhas do gênero *Loxosceles* desencadeiam nos acidentados um quadro clínico denominado loxoscelismo que pode levar ao óbito. No veneno destas aranhas estão presentes as fosfolipases D, responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos observados no loxoscelismo. Diante disto, um soro de segunda geração produzido a partir de fosfolipases D (recombinantes, biologicamente inativas, mas ativas como estimulantes antigênicos) está sendo desenvolvido por pesquisadores da UFPR, CPPI e UEPG. No entanto, outras toxinas como as TCTPs parecem estar relacionadas com a potencialização das fosfolipases-D. Neste trabalho estão sendo realizadas investigações em pele de coelhos para se observar a eficácia do soro de segunda geração e a ação das TCTPs. Análises das lâminas histológicas mostraram que a TCTP potencializou os efeitos das fosfolipases provavelmente por aumentar a permeabilidade vascular e vasodilatação levando a um aumento da resposta inflamatória. A compreensão das moléculas presentes no veneno e maneiras de inativá-las poderão contribuir para a obtenção de produtos que minimizem os efeitos do loxoscelismo e a rápida recuperação do paciente.

Introdução

Vários estudos com o veneno das aranhas *Loxosceles* têm mostrado que a sua composição bioquímica consiste de uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos, principalmente proteínas e peptídeos com ação tóxica e/ou enzimática (GREMSKI, *et al*., 2010). Análises de transcriptomas de glândulas de veneno de diferentes espécies apresentaram diferentes perfis para as diferentes famílias de toxinas expressas. As fosfolipases-D (PLD) são as toxinas que caracterizam os venenos das aranhas *Loxosceles* e têm sido relatadas como as principais responsáveis pelo desenvolvimento dos sinais clínicos e sintomas do loxoscelismo e podem promover agregação plaquetária, hemólise, letalidade, nefrotoxicidade e hiperpermeabilidade vascular (da SILVA *et al.*, 2004; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). O transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* também revelou a sequência de uma proteína identificada como membro da família TCTP (***T**ranslationally **C**ontrolled **T**umor **P**rotein)* (GREMSKI *et al*., 2010), esta proteína é um fator de libertação de histamina (HRF) (McDONALD *et al*., 1995) e fortilina (LI *et al*., 2001). Reações alérgicas, de hipersensibilidade ou dor observadas após o envenenamento podem estar associadas com eventos histaminérgicos, tais como um aumento na permeabilidade vascular e vasodilatação. A caracterização

funcional da TCTP recombinante de *L. Intermedia* (LiTCTP), mostrou que esta toxina causou edema e permeabilidade vascular aumentada contribuindo para os efeitos de outras toxinas e consequentemente com as características clínicas que ocorrem durante o envenenamento (SADE *et al*., 2012).
A proposta inicial deste trabalho que está sendo realizado por um grupo de pesquisadores de três renomadas instituições localizadas no estado (UFPR; UEPG e CPPI) foi testar e analisar o potencial inibitório de um soro de segunda geração sobre os conhecidos efeitos biológicos causados pelos venenos de três espécies de aranhas do gênero Loxosceles envolvidas em acidentes no estado (*L. intermedia*, *L. gaúcho* e *L. laeta*). O soro está sendo obtido a partir de toxinas dermonecróticas (fosfolipases-D), recombinantes, com mutações pontuais e biologicamente inativas, mas ativas como estimulantes antigênicos. No entanto, a investigação prévia dos efeitos de outras toxinas que também possam causar outros danos ou interferir nos efeitos das fosfolipases D se fazem necessários. Para isto, neste trabalho, foram feitas análises histopatológicas da pele de coelho submetidas ao tratamento com fosfolipases D e com fosfolipases D na presença de TCTP.

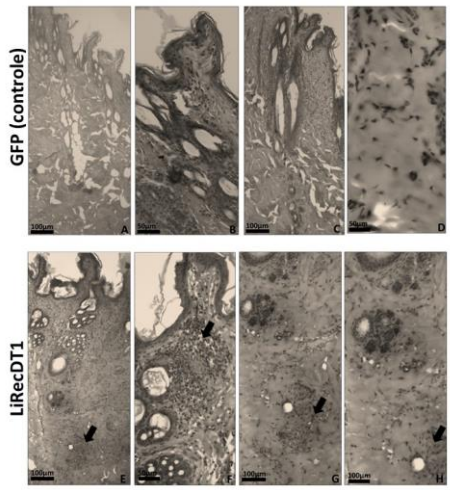
Materiais e Métodos

Realizados externamente a UEPG e em parceria com outras instituições: As etapas de extração de veneno total; clonagem; mutações sítio dirigidas; expressão e purificação das proteínas recombinantes, foram realizadas na UFPR. Para os ensaios de atividade dermonecrótica foram realizadas aplicações intradérmicas (5 μg) em coelhos da mistura de fosfolipases D recombinantes de aranha-marrom (*L. intermedia, L. gaucho* e *L. laeta*) diluídos em PBS ou da mistura das fosfolipases D de aranha-marrom na presença de TCTP (10 e 20 μg). Como controle negativo foram obtidas amostras da pele de coelho tratadas com GFP (green fluorescente protein). Após 24h tratamento, os animais foram eutanasiados com superdose de Cloridrato de Cetamina (180 a 240 mg/kg do animal) e Xilazina (24 a 45 mg/kg do animal) para a retirada das amostras de tecido os quais foram submetidos a fixação com Bouin e posteriormente mantidos em álcool 70%.
Realizados no laboratório M-60, Bloco M, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG: Os cortes de pele obtidos a partir do ensaio descrito anteriormente foram transferidos para a UEPG e submetidos aos procedimentos para montagem de lâminas histológicas em H.E e fotografados.

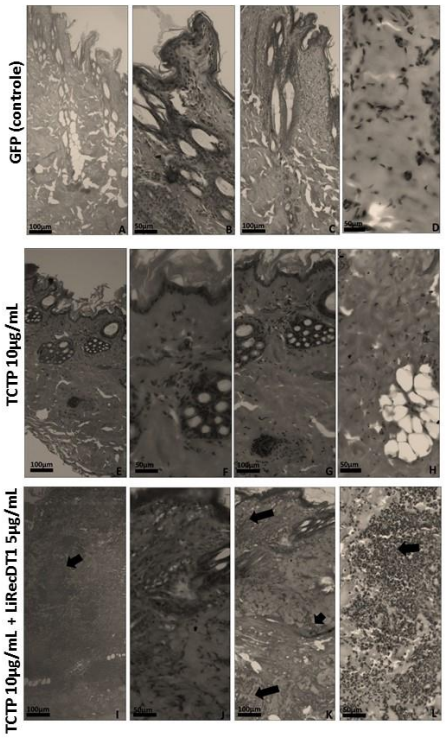
Resultados e Discussão

As amostras de pele submetidas ao tratamento com as fosfolipases D mostraram que estas toxinas foram capazes de promover infiltração leucocitária (flechas) dos vasos sanguíneos para o tecido conjuntivo da derme (figuras 1E, F, G e H), característica da resposta inflamatória. Estes resultados tornam-se bastante evidentes quando comparados ao controle em que a pele foi tratada com GFP, uma proteína verde fluorescente que não causa resposta inflamatória (figuras 1A, B, C e D). Em diversos organismos as TCTPs estão relacionadas a processos celulares fundamentais tais como: ciclo celular, proliferação e apoptose (AMSON *et al*, 2013; THEBAULT *et al*, 2016). Hipóteses para a presença de TCTPs no veneno das aranhas marrom têm sido levantadas, porém a mais aceita delas é a de que esta proteína esteja relacionada ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação causada pelos seus efeitos histaminérgicos e isto poderia contribuir para infiltração de leucócitos polimorfonucleares dos vasos sanguíneos para a derme da pele e

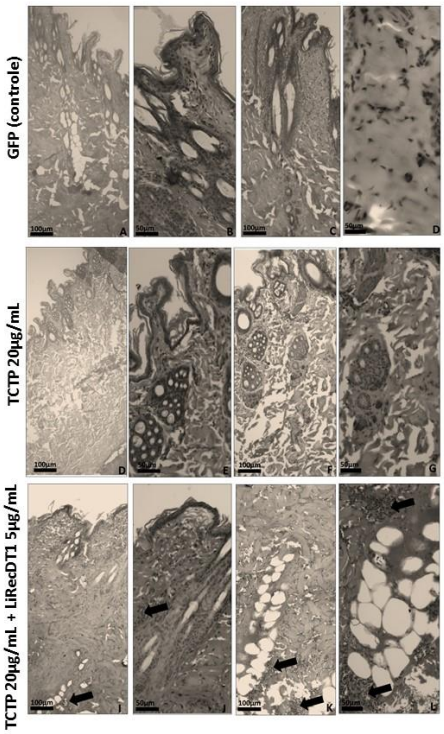
aumento da resposta inflamatória. SADE et al., (2012) mostrou um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos em camundongos tratados com TCTP recombinante do veneno de *Loxosceles intermedia.* Para confirmar esta hipótese, foram realizados testes das fosfolipases D injetadas na pele de coelho na presença de TCTP nas concentrações de 10 e 20µg/mL (figuras 2 e 3 respectivamente). Os resultados obtidos mostram que houve uma amplificação da resposta inflamatória (flechas) em ambas as concentrações de TCTP testadas e estão de acordo com os resultados obtidos por SADE et al., 2012.



◄ **Figura 1: Análise morfológica da pele de coelhos submetida ao tratamento com a mistura de fosfolipases D recombinantes obtidas de aranhas do gênero *Loxosceles*. Imagens obtidas por microscopia de luz. (A, B, C e D)** Pele de coelho tratada com GFP (controle negativo). Aumento de 100, 400, 200 e 600x respectivamente. **(E, F, G e H)** Pele de coelho tratada com 5µg da mistura de fosfolipases D recombinantes de aranhas do gênero *Loxosceles*. Aumento de 100, 400, 200 e 400x respectivamente.



◄ **Figura 2:** Presença da proteína TCTP na concentração de 10µg/mL. (A, B, C e D) Pele de coelho tratada com GFP (controle negativo). (E, F, G e H) Pele de coelho tratada com TCTP na concentração de 10µg/mL. (I, J, K e L) Pele de coelho tratada com 5µg da mistura de fosfolipases D recombinantes de aranhas do gênero *Loxosceles* na presença de TCTP na concentração de 10 µg/mL. Da esquerda para a direita, as figuras estão em aumento de 100, 400, 200 e 400x respectivamente.



◄ **Figura 3:** Presença da proteína TCTP na concentração de 20µg/mL. (A, B, C e D) Pele de coelho tratada com GFP (controle negativo). (E, F, G e H) Pele de coelho tratada com TCTP na concentração de 20µg/mL. (I, J, K e L) Pele de coelho tratada com 5µg da mistura de fosfolipases D recombinantes de aranhas do gênero *Loxosceles* na presença de TCTP na concentração de 20 µg/mL. Da esquerda para a direita, as figuras estão em aumento de 100, 400, 200 e 400x respectivamente.

Estes resultados abrem a possibilidade de novas investigações quanto ao papel desta toxina nos venenos loxoscélicos, bem como, a busca por maneiras de inativar esta molécula e diminuir os efeitos do envenenamento.

Conclusões

Algumas classes de moléculas podem ter um papel importante para a potencialização das fosfolipases D e as TCTPs têm sido investigadas quanto a isso. Estas moléculas parecem contribuir com o aumento permeabilidade vascular e vasodilatação aumentando os espaços para a passagem de elementos do sangue para o tecido conjuntivo da derme e consequentemente da resposta inflamatória. A produção de um soro mais eficaz contra as fosfolipases D, com maior especificidade e com maior título de anticorpos neutralizantes bem como a compreensão de outras moléculas presentes no venenos e de maneiras de inativá-las poderão grandemente contribuir para a produção de medicamentos que minimizem os efeitos do loxoscelismo e a rápida recuperação do paciente.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Ponta Grossa por proporcionar o desenvolvimento deste trabalho, ao CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Referências

AMSON, R., KARP, J.E., TELERMAN, A. Lessons from tumor reversion for cancer treatment. **Curr Opin Oncol** 25: 59–65, 2013.

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

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

LI, F., ZHANG, D., FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **J. Biol. Chem.** 276: 47542–47549, 2001.

McDONALD, S.M., RAFNAR, T., LANGDON, J., LICHTENSTEIN, L.M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. **Science** 269: 688–690, 1995.

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

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

THEBAULT, S., AGEZ, M., CHI, X., STOJKO, J., CURA, V., TELERMAN, S.B., MAILLET, L., GAUTIER, F., BILLAS-MASSOBRIO, I., BIRCK, C., TROFFER-CHARLIER, N., KARAFIN, T., HONORE, J., SENFF-RIBEIRO, A., MONTESSUIT, S, JOHNSON, C.M., JUIN, P., CIANFERANI, S., MARTINOU, J.C., ANDREWS, D.W., AMSON, R., TELERMAN, A., CAVARELLI, J. TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL. **Scientific Rep** 6: 19725, 2016.