XXXII Encontro Anual de Iniciação Científica
IX Encontro Anual de Iniciação Científica Jr.
EAIC 2023

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA TOXINA RECOMBINANTE LiRecDT1 H12A AO SISTEMA RENAL DE RATOS

Alexandre Horne Larocca (PIBIC/FA), Suelen Queiroz, Cristina Lúcia Santana Costa Ayub, Ana Carolina Martins Wille (Orientador), e-mail: anacarolina.wille@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área do conhecimento: Morfologia; Subárea: Histologia.

Palavras-Chave: *Aranha Marrom, Loxosceles, Fosfolipases-D.*

Resumo

As principais enzimas que atuam no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, são as fosfolipases-D. Essas toxinas foram produzidas de forma recombinante pelo laboratório de biotecnologia de venenos de animais peçonhentos da UFPR com pequenas alterações na sequência de nucleotídeos (mutações). Essas alterações visaram diminuir o potencial enzimático da molécula sem perder o potencial imunizante. Neste trabalho foram avaliados por meio de análise histológica, os efeitos imunogênicos/protetores de uma fosfolipase-D mutada (LiRecDT1 H12A) sobre a membrana basal e túbulos renais que posteriormente foram desafiados com outras fosfolipases-D loxoscélicas com atividade catalítica. Os resultados mostraram que a fosfolipase-D mutada LiRecDT1 H12A teve efeito imunogênico especialmente após o tratamento com as fosfolipases com atividade enzimática nas menores concentrações.

Introdução

A fosfolipase-D (LiRecDT1 H12A) mutada obtida a partir da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia* foi produzida de maneira recombinante com uma mutação pontual no seu domínio catalítico (troca da histidina 12 por uma alanina). A alteração do aminoácido altera sua funcionalidade, uma vez que o sítio catalítico das fosfolipases é histidina-dependente (POLLI et al., 2021) Espera-se, dessa forma, que esta fosfolipase D mutada induza imunogenicidade aos animais que a recebem sem causar os danos biológicos descritos para as fosfolipases-D com atividade catalítica.

Materiais e Métodos

Ratos albinos, linhagem (Wistar), foram previamente sensibilizados com a fosfolipase-D recombinante LiRecDT1H12A. Os animais foram imunizados (via intraperitoneal) com doses crescentes (30µg, 60µg e 100µg) e com intervalo de 3 semanas entre cada aplicação. Na terceira semana após a última imunização foram desafiados por 24h com uma mistura de fosfolipases-D recombinantes com atividade enzimática das aranhas *L. intermedia, L. gaucho e L. laeta* nas concentrações de 30, 40 e 50µg/mL, respectivamente. Como controle, um grupo de animais foi tratado apenas com PBS. Foram feitas lâminas histológicas coradas com H.E. e P.A.S de todas as amostras. Os resultados foram analisados quanto a integridade da arquitetura do órgão (H.E.), integridade das membranas basais (PAS) e outros, por meio de escores. Foram analisados 18 campos de cada variável, obtidos de três animais (aumento de 200x). Para a avaliação dos resultados as variáveis foram submetidas a análise estatística pelo teste ANOVA e não paramétrica de Kruskal-Wallis.

Resultados e Discussão

Na figura 1, é possível observar nos cortes corados com P.A.S., que o tratamento prévio com LiRecDT1 H12A foi menos eficaz nas concentrações mais altas da mistura de fosfolipases D ativas testadas (40 e 50µg/mL), do que na concentração de 30µg/mL. Da mesma forma, nas lâminas coradas em H.E., apenas nas maiores concentrações foi possível observar sinais de alterações morfológicas como vacuolizações e presença de conteúdo protéico no lúmen tubular renal. Apesar das considerações feitas acima, dados da literatura mostram danos mais graves em animais expostos ao veneno nativo ou as fosfolipases-D sem o tratamento prévio com LiRecDT1 H12A, o que reforça o papel imunogênico e protetor desta molécula diante do envenenamento.

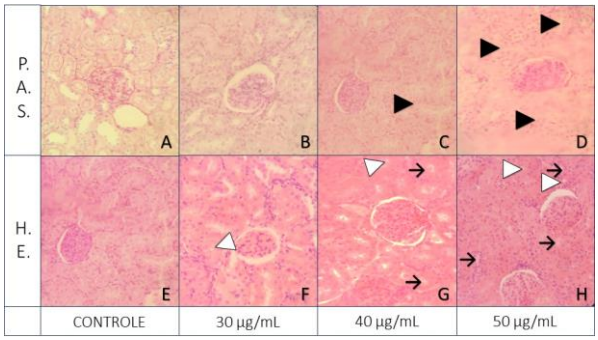


Figura 1. Rins de ratos previamente tratados com a fosfolipase-D recombinante mutada LiRecDT1 H12A e posteriormente submetidos a ação de uma mistura de fosfolipases-D loxoscélicas com atividade catalítica em diferentes concentrações. (A, B, C e D) Rins corados pela técnica de P.A.S. **(E, F, G e H)** Rins corados pela técnica de H.E. **(A e E)** Controles (PBS). **(B e F), (C e G), (D e H)** Rins de animais previamente imunizados com LiRecDT1 H12A e desafiados com as fosfolipases-D loxoscélicas com atividade catalítica nas concentrações de 30, 40 e 50µg/mL, respectivamente. Cabeças de seta pretas apontam áreas com perda da membrana basal, cabeças de seta brancas apontam vacuolizações e as setas mostram presença de conteúdo protéico nos túbulos renais. Aumentos de 200x.

Pela análise estatística não-paramétrica obteve-se diferença significativa entre os resultados do controle e das concentrações de 40µg e 50µg, porém, não houve diferenças entre o controle e a concentração de 30µg.

Conclusão

Foi possível verificar que a fosfolipase-D recombinante mutada LiRecDT1 H12A foi capaz de inibir os efeitos deletérios causados pelas fosfolipases-D de aranhas *Loxosceles* na concentração de 30µg/mL em rim de ratos.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, à UEPG e à minha orientadora Dr. Ana Carolina Martins Wille.

POLLI, N et al. A protective vaccine against the toxic activities following Brown spider accidents based on recombinant mutated phospholipases D as antigens. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. l.]*, v. 192, p. 757–770, 2021.