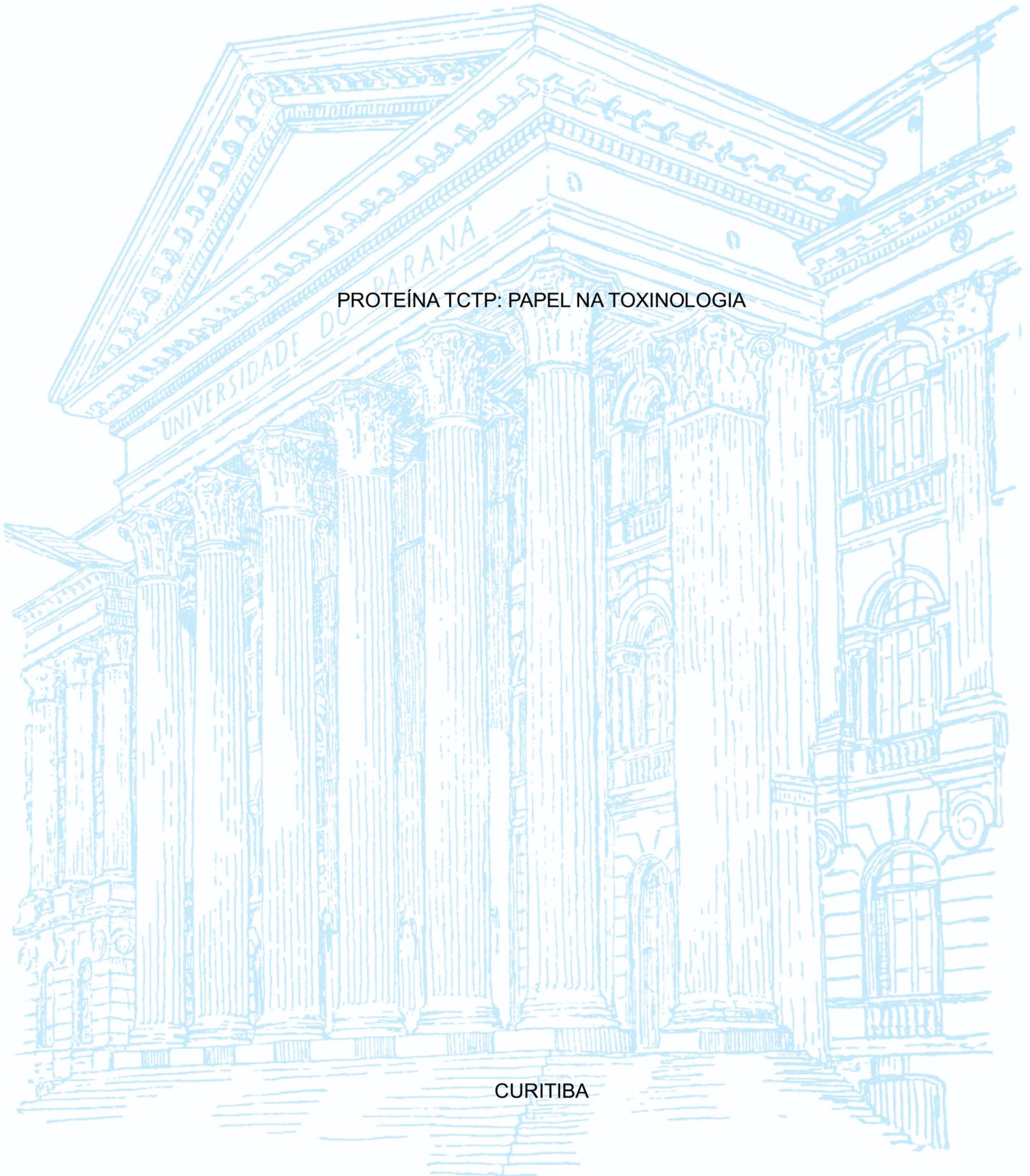


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAMILA GRAUDIN MORENO

PROTEÍNA TCTP: PAPEL NA TOXINOLOGIA

CURITIBA



2021
KAMILA GRAUDIN MORENO

PROTEÍNA TCTP: PAPEL NA TOXINOLOGIA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Andrea Senff-Ribeiro

Coorientadoras: Prof^a Dr^a Marianna Boia Ferreira e Ma. Antonielle Beatriz Baldissera

CURITIBA
2021

TERMO DE APROVAÇÃO

KAMILA GRAUDIN MORENO

PROTEÍNA TCTP: PAPEL NA TOXINOLOGIA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.



Prof(a). Dr(a). Andrea Senff Ribeiro
Orientador(a) – Departamento Biologia Celular, UFPR

Prof(a). Dr(a). Patrícia Dalzoto
Departamento Patologia Básica, UFPR

Prof. Dr. Thales Cipriani
Departamento Bioquímica, UFPR

Curitiba, 22 de março de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, pelo carinho, apoio e incentivo a continuar tentando. Vitor, Letícia e Eduardo, vocês foram o trio de ouro da minha vida, assistiram minhas noites de crise muitas vezes e permaneceram do meu lado, me oferecendo um abraço do tamanho do mundo ou palavras de conforto. Amo vocês demais.

Obrigada aos amigos que me deram todo o suporte do mundo, mesmo que de longe nesses últimos tempos. Fernanda e Mayana, impossível não registrar aqui o quão importantes e presentes vocês se fizeram na minha vida e o quão grata eu sou por isso.

Ao LME, que por tantos anos me acolheu e foi o lugar onde me desenvolvi não só profissionalmente, mas onde também fiz amigos, sorri, chorei e aprendi. Foi no LME que também encontrei as orientadoras que me guiaram neste e em outros projetos, professora Andrea, Marianna e Antonielle. Obrigada aos professores pela oportunidade de fazer parte dessa equipe.

Agradeço também as agências de fomento, Fundação Araucária e CNPq, que me deram a oportunidade de seguir na faculdade com apoio financeiro e me proporcionaram um experiência pela qual me sinto privilegiada.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”

(NIETZSCHE, Friedrich)

RESUMO

A *Translationally Controlled Tumour Protein* (TCTP) é uma proteína altamente conservada, expressa em diversos eucariotos e é chamada de multifuncional por estar envolvida em diversos processos biológicos. Estas diferentes funções são responsáveis por seus diferentes nomes, como por exemplo, *histamine-releasing factor* (HRF) por sua atividade liberadora de histamina. A proteína está presente na glândula produtora de veneno da aranha-marrom *Loxosceles intermedia* (LiTCTP) e em sua secreção. O objetivo deste trabalho foi estudar as propriedades histaminérgicas da TCTP recombinante de *L. intermedia* (LiRecTCTP) *in vitro* e *in vivo*. A LiTCTP recombinante usada nos testes foi obtida pura e em condições adequadas para os ensaios *in vitro* e *in vivo*. O estudo das características estruturais da LiRecTCTP recombinante produzida foi realizado por meio de dicroísmo circular. A proteína apresentou 8,85% de estruturas em α -hélice e 33,61% de folhas- β , conforme esperado. A ação da toxina no influxo de cálcio *in vitro* foi avaliada na linhagem celular RBL-2H3. A LiRecTCTP aumentou o influxo celular de cálcio, efeito que está relacionado com a atividade histaminérgica da toxina recombinante. Nos ensaios *in vivo* foram avaliados os efeitos de dermonecrose, edema, eritema e inflamação em coelhos. Houve aumento de edema e eritema após 3h, 6h e 24h do tratamento com a LiRecTCTP; assim como a toxina promoveu o aumento da lesão dermonecrótica no controle positivo (inoculação da toxina dermonecrótica LiRecDT1). Este projeto avançou na caracterização da TCTP de *Loxosceles intermedia*, melhor compreendendo sua atividade biológica e participação no loxoscelismo (quadro clínico decorrente da picada por aranha-marrom). Além disso, amplia as perspectivas de possibilidades biotecnológicas da toxina. O trabalho elucidou a importância da LiRecTCTP e os resultados instigam a continuação dos estudos sobre esta proteína.

Palavras-chave: TCTP, *Loxosceles*, *L. intermedia*, aranha marrom, fator de liberação de histamina, HRF.

ABSTRACT

Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP), a highly conserved protein, is expressed in several eukaryotes and it is multifunctional, presenting numerous biological functions. These functions are responsible for the many names that TCTP has, such as histamine-releasing factor (HRF) for their histamine releasing activity. The protein is present in the venom gland of the brown spider *Loxosceles intermedia* (LiTCTP). The aim of this work was to study the histaminergic properties of recombinant *L. intermedia* TCTP (LiRecTCTP) *in vitro* and *in vivo*. Recombinant LiTCTP used in the assays was obtained pure and under conditions suitable for the assays. To evaluate the structural characteristics of LiRecTCTP, the circular dichroism assay was performed and the protein showed 8.85 % of structures in α -helix, and 33.61 % of β -sheet. RBL-2H3 cell line was treated with LiRecTCTP and the calcium influx was evaluated. The increased calcium influx resulting from treatment with LiRecTCTP is related to the histaminergic activity of the recombinant toxin. *In vivo* assay using rabbits were performed and the effects of dermonecrosis, edema, erythema and inflammation were evaluated. At 3h, 6h and 24h, an increase in edema and erythema was observed for LiRecTCTP, as well as an increase in the dermonecrotic lesion in the positive control, LiRecDT1. This study sought to characterize TCTP of *Loxosceles intermedia* to better understand its activity, in the context of loxoscelism (clinical condition resulting from the bite by brown spider) and regarding the biotechnological possibilities of the toxin. The research elucidated the importance of LiRecTCTP and the results prompt further studies on this protein.

Keywords: TCTP, *Loxosceles*, *L. intermedia*, brown spider, histamine release factor, HRF.

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO.....	9
1.1JUSTIFICATIVA.....	10
1.2OBJETIVOS	10
1.2.1Objetivo geral.....	10
1.2.2Objetivos específicos	10
2REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP).....	10
2.2TCTP e Loxoscelismo	12
2.3LiTCTP e Atividade Liberadora de Histamina.....	15
3MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1Expressão e Purificação da Proteína	16
3.2SDS-PAGE	17
3.3Dosagem de Proteínas (Micro BCA)	18
3.4Dicroísmo Circular.....	18
3.5Cultivo celular.....	19
3.6Influxo de Cálcio.....	19
3.7DERMONECROSE <i>IN VIVO</i>	19
3.8Análise estatística.....	20
4RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1Produção e purificação da proteína recombinante LiRecTCTP.....	20
4.2Dicroísmo Circular.....	22
4.3Influxo de Cálcio.....	24
4.4Dermonecrose.....	25
5CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
ANEXO 1 – ARTIGO	31

1 INTRODUÇÃO

A LiTCTP é uma proteína da família TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) encontrada no veneno da aranha-marrom *Loxosceles intermedia*, uma das espécies de importância médica no Brasil. No Paraná, estas aranhas estão relacionadas a inúmeros casos de envenenamento. O loxoscelismo é o quadro clínico decorrente da picada da aranha-marrom, manifestando-se com necrose, espalhamento gravitacional e uma resposta inflamatória massiva, precedidas por eritema, edema e coceira no local da picada (SADE, 2009; SADE et al., 2012). O veneno loxoscélico é composto de toxinas proteicas, sendo grande parte delas já identificadas e caracterizadas bioquimicamente. Dados de transcriptoma de *L. intermedia* mostraram que a LiTCTP corresponde a 0,4% dos transcritos de toxinas da glândula de veneno (GREMSKI et al., 2010).

A TCTP é uma proteína altamente conservada e amplamente expressa nos eucariotos (BOMMER; THIELE, 2003). Após ser descoberta, há aproximadamente 35 anos (BOMMER, 2017), suas atividades vêm sendo estudadas e suas diversas funções levaram outros autores a sugerirem outros nomes, como fortalina e HRF (*histamine-releasing factor*), por atuar como um fator liberador de histamina (BOMMER; THIELE, 2003).

A toxina LiRecTCTP foi produzida em sistema procariótico de expressão heteróloga (*E. coli*) e suas características bioquímicas e biológicas puderam ser estudadas. Sade (2009) sugere, a partir de análises de alinhamento aminoacídico, que a capacidade de ligar cálcio está preservada na LiTCTP, além de conter aminoácidos responsáveis pela interação com proteínas G, indicando seu possível papel na regulação do crescimento e proliferação celular. A LiTCTP não possui sítio de fosforilação para Plk (polo-like kinase 1), encontrados apenas em humanos, camundongos e ratos. Estes resultados também sugerem que a proteína não estaria diretamente envolvida na estabilização de microtúbulos. A análise filogenética sugere

atividade como fator liberador de histamina, por similaridade ao grupo de TCTP dos carrapatos (SADE et al., 2012).

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando sua relevância, o estudo procurou investigar e compreender os efeitos toxicológicos da TCTP presente no veneno da aranha-marrom, no contexto loxoscélico e em relação às possíveis aplicações biotecnológicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar o papel biológico da TCTP no contexto do loxoscelismo.

1.1.1 Objetivos específicos

Expressar e purificar a proteína TCTP de *Loxosceles intermedia* (LiRecTCTP);
Caracterizar a estrutura secundária da proteína recombinante TCTP de *Loxosceles intermedia*;
Caracterizar a atividade histaminérgica da TCTP *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOUR PROTEIN (TCTP)

As proteínas da família TCTP (*Translationally Controlled Tumour Protein*) são altamente conservadas e amplamente expressas em eucariotos. Após ser descrita pela primeira vez, muitas funções foram atribuídas às TCTPs. A proteína recebeu este nome baseado no fato de que o cDNA foi clonado de um tumor humano e observou-se que é regulada traducionalmente (BOMMER; THIELE, 2003). A TCTP vem

despertando o interesse dos pesquisadores, pois seu papel nos organismos não é bem esclarecido, embora suas propriedades biológicas sejam diversas, conforme é possível observar na figura 1 (BOMMER; TELERMAN, 2020).

Esta proteína possui baixa massa molecular, cerca de 23 kDa, e são conhecidas suas funções como um fator liberador de histamina, proteína ligadora de tubulina e substrato polo-like kinase 1 (Plk), além de ter função anti-apoptótica, com atividade antagonista à P53. Foi observado que em tumores encontra-se super expressa, e por isso já foi descrita como possível alvo no processo de reversão tumoral (TELERMAN; AMSON, 2009).

Em 2011, Amson e colaboradores descreveram a atividade antagonista da TCTP e P53. A P53 está ligada a atividade de controle do ciclo celular e indução da apoptose celular, dessa forma, quando a P53 está ativada age como repressora da expressão de TCTP. A TCTP é também fundamental no desenvolvimento, sendo que o *knockout* em moscas do gênero *Drosophila* e camundongos é letal para as larvas em primeiro estágio tardio, e para os camundongos ainda no útero (HSU et al., 2007 apud BALDISSERA, 2017; AMSOM et al., 2011).

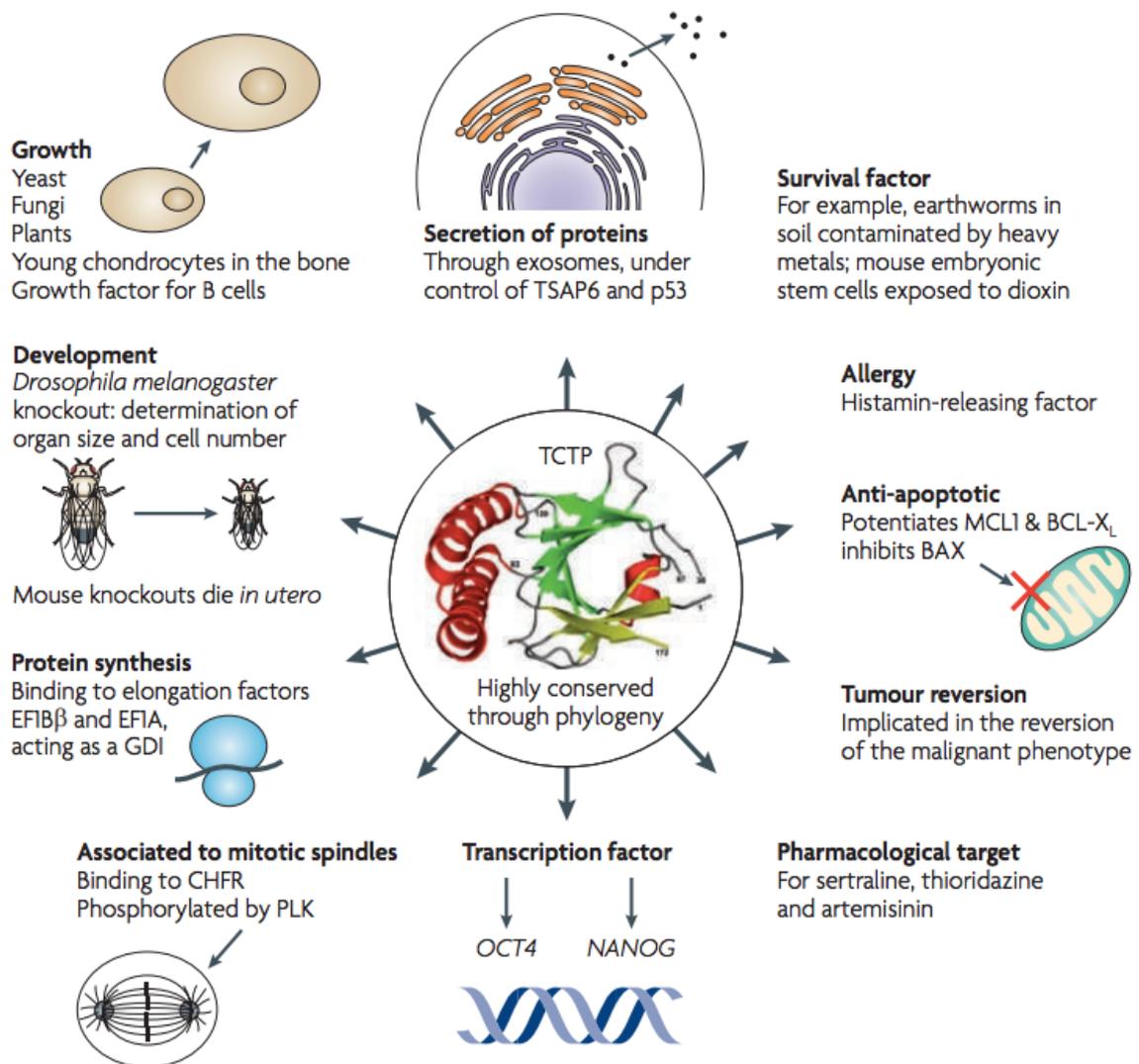


Figura 1: TCTP e suas diferentes funções e atividades biológicas (TELERMAN; AMSON, 2009).

2.2 TCTP E LOXOSCELISMO

A TCTP encontrada no veneno da aranha-marrom *Loxosceles intermedia* foi denominada LiTCTP e relacionada com os efeitos nocivos característicos do loxoscelismo decorrente da picada. Essa proteína compõe 0,4% dos transcritos de toxinas do veneno de aranha-marrom, como observado na figura 2 (GREMSKI et al., 2010).

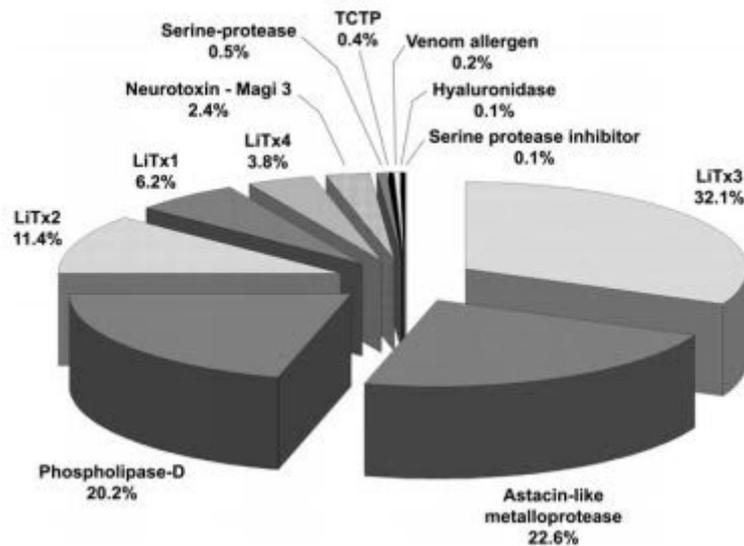


Figura 2: A LiTCTP corresponde a 0,4% dos transcritos de toxinas do veneno de aranha-marrom *L. intermedia*. (GREMSKI et al., 2010)

A *Loxosceles sp* está presente no mundo todo e sua sobrevivência em diferentes lugares pode ser explicada por sua capacidade de se adaptar a condições adversas (da SILVA et al., 2004). A característica marcante desse gênero é o formato em violino do seu cefalotórax (da SILVA et al., 2004). São pequenos, em torno de 4 cm de diâmetro, com pernas longas e finas, além de apresentarem leve dimorfismo sexual, como observado na figura 3 (Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, 2020). Dependendo do local onde se encontra, pode receber diversos nomes, em referência às suas características, como, por exemplo, aranha-marrom, devido à sua coloração que varia do marrom claro ao escuro.

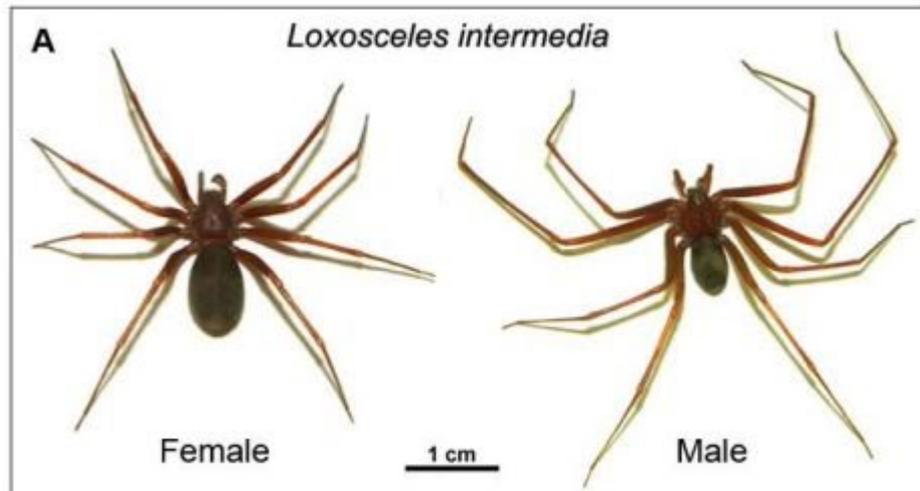


Figura 3: Morfologia e dimorfismo sexual da aranha-marrom da espécie *L. intermedia* (CHAIM et al, 2011).

Estes animais não costumam ser agressivos mas, ao sentirem-se ameaçados, podem atacar. A picada é indolor e só é percebida horas após o acidente, devido ao desenvolvimento do quadro loxoscélico (GUIMARÃES, 2009). Segundo Guimarães (2009), o loxoscelismo representa um problema de saúde pública, principalmente no Paraná, além de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. De acordo com os dados do site da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (2020) são registrados em média 2.557 acidentes por ano.

O loxoscelismo caracteriza-se por sintomas locais e sistêmicos. As reações comumente variam de eritema local a grandes áreas de ulceração e necrose, sendo que entre 2 a 8 horas após a picada outros sintomas surgem, como dor, isquemia, eritema com prurido, inchaço e sensibilidade (FUTRELL, 1992 apud TAMBOURGI, 2010).

Os sintomas mais comuns apresentados pelas vítimas são dor em queimação, vermelhidão, mancha roxa, inchaço, bolhas, coceira e endureção, além de outras alterações mais tardias como necrose, dor de cabeça, mal-estar geral, náusea, dores pelo corpo. Na imagem abaixo (figura 4), é possível observar a evolução da lesão característica do quadro loxoscélico.



Figura 4: À esquerda lesão ocasionada poucas horas após o acidente com aranha-marrom. À direita, lesão dermonecrotica após 7 dias (adaptado de Secretária de Saúde do Estado do Paraná, 2020).

2.3 LITCTP E ATIVIDADE LIBERADORA DE HISTAMINA

Muitos dos sintomas da inflamação estão ligados a atividade de histamina (PALUDO et al., 2009), e envolvimento da LiTCTP no processo inflamatório resultante no local da picada foi relacionado ao seu efeito histaminérgico (SADE, 2009). MacDonald e colaboradores (1995) demonstraram que proteínas da família TCTP/HRF atuam no processo inflamatório por diversos mecanismos, sendo que não se liga ao receptor de IgE diretamente, podendo atuar em um receptor próprio ainda não conhecido. As ações da histamina são mediadas por 4 subtipos de receptores (H1, H2, H3 e H4), sendo acoplados à proteína G e diferem entre si nas vias de segundos mensageiros e na sua distribuição tecidual. Os receptores H1 são expressos primariamente nas células endoteliais vasculares e nas células musculares lisas. Esses receptores medeiam reações inflamatórias e alérgicas. A principal função do receptor H2 consiste em mediar a secreção de ácido gástrico no estômago, receptores H3 e H4 ainda não tem suas funções muito bem definidas, mas estão presentes em mastócitos, basófilos e eosinófilos e medeiam reações inflamatórias (FAUSTINO-ROCHA et al., 2016).

Sade e colaboradores (2012) demonstraram o efeito relevante da LiRecTCTP isolada em comparação com o veneno total na formação de edema e aumento da permeabilidade vascular em camundongos.

Recentemente, em experimentos com camundongos foram avaliados inibidores específicos de receptores de histamina na inibição dos efeitos da

LiRecTCTP: prometazina (inibidor de receptor H1), cimetidina (inibidor de receptor H2), tioperamida (inibidor de receptor H3 e H4), bem como um inibidor de degranulação de mastócitos, o cromoglicato. Assim como observado por Sade e colaboradores em 2012, a LiRecTCTP foi capaz de gerar aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, edema (BOIA-FERREIRA et al., 2019). Além disso, observou-se uma diferença de afinidade da LiRecTCTP pelos receptores em ambos os ensaios (edema e permeabilidade) (cromoglicato > tioperamida > prometazina > cimetidina). O cromoglicato é um inibidor de degranulação de mastócitos, o que explica sua maior atividade inibitória, enquanto a cimetidina, que é inibidor de HR2, células que estão presentes preferencialmente na mucosa gástrica, não teve efeito significativo na redução da ação da LiRecTCTP. Esses resultados reforçam o papel dessa proteína como um fator liberador de histamina (BOIA-FERREIRA et al., 2019).

Neste trabalho foi produzida a LiRecTCTP de forma recombinante, purificada a proteína e foram avaliadas suas características estruturais. A toxina recombinante foi utilizada em ensaios *in vitro* de influxo celular de cálcio e ensaio de dermonecrose *in vivo* utilizando coelhos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

A LiTCTP recombinante utilizada foi obtida através da expressão em cultivo bacteriano (*Escherichia coli*) e purificada por cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-NTA agarose. A proteína foi expressa contendo um His-Tag N-Terminal para possibilitar sua purificação. A cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3) pLysS competente foi transformada com a construção para LiTCTP em vetor pET14b utilizando o protocolo descrito por Sade et al., (2012) e congelada. Deste congelamento, 10 µL foram inoculados em 10 mL de meio LB líquido, contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. A solução foi mantida sob agitação por 16 horas a 37 °C.

Em seguida, os 10 mL foram vertidos em um frasco Erlenmeyer contendo 1 L de LB líquido, também contendo cloranfenicol e ampicilina, e mantido sob agitação a 37 °C até atingir a densidade óptica ideal (entre 0,4 e 0,6). Com isso, uma amostra de T0 (tempo antes da indução) foi coletada, e o frasco levado ao banho de gelo. Ao ser resfriado adicionou-se o indutor, IPTG (0,1 mM), e a solução retornou para agitação por mais 4 horas a 23 °C. Novamente ao banho de gelo, uma amostra de T1 (tempo após a indução) foi retirada. A cultura foi centrifugada, ressuspensa em 40 mL de tampão de ligação nativo (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM e lisozima 1 mg/mL) e congelada. Para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-NTA, as células foram descongeladas e lisadas no sonicador, e, em seguida, a solução foi centrifugada. O sobrenadante foi incubado por 1 hora a 4 °C com a resina e empacotado na coluna. A lavagem da resina será com tampão de lavagem nativo (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 35 mM) e a absorbância foi monitorada, considerando o ideal próximo a zero. Quando atingiu o ideal, o tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 350 mM) foi passado pela resina. A absorbância foi monitorada até ficar próximo do valor correspondente à metade do coeficiente de extinção da proteína. O coeficiente de extinção é a densidade óptica condizente a 1 mg/mL da proteína. Este valor foi determinado para ter uma menor perda de proteína na diálise, por insolubilidade, de acordo com a literatura. Durante esse processo, o eluato deve ser mantido no gelo, e por fim, dialisado em PBS (phosphate-buffered saline), trocando a solução três vezes, as duas primeiras a cada duas horas e a última por 16 horas.

3.2 SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 15%. Os marcadores e amostras com tampão redutor foram pipetados nos poços, e a corrida eletroforética

realizada a 25 mA. A visualização das proteínas foi feita pela coloração do gel com Azul de *Coomassie* 2,5%.

3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS (MICRO BCA)

Para dosar a proteína recombinante foi utilizado o kit *Micro BCA Protein Assay Kit* (ThermoScientific, Waltham, USA). A dosagem foi feita em placa de 96 poços, onde a curva padrão e as amostras em diluições de 1:10 foram adicionadas, todas em duplicata, com volume final de 20 μ L por poço. O reagente foi adicionado, e a placa incubada a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, a leitura foi feita em 550 nm, no equipamento Meridian/EL x800.

3.4 DICROÍSMO CIRCULAR

Para o dicróismo circular uma alíquota de LiRecTCTP de 1 mL foi utilizada, sendo dialisada e concentrada a 4 °C contra tampão fosfato (20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.4 e 150 mM NaCl) para a concentração final de 1 mg/mL. Uma alíquota de LiRecDT1 (toxina dermonecrótica recombinante) na mesma concentração foi utilizada como controle. A substituição do tampão deve ser realizada para evitar a interferência dos sais no experimento. O aparelho utilizado (Jasco J-815) emite uma luz circularmente polarizada em direção à cubeta, a luz refletida é captada e lida, utilizando uma faixa de 195 a 350 nm. Os resultados são fornecidos em milidegree (MRE) e são convertidos para elipticidade molar (MRW) utilizando a seguinte fórmula: $(MRE) = (MRW \text{ abs}) / 10 [g/L] L$, onde MRW é a massa molecular dividida pelo número de resíduos de aminoácidos. O resultado final foi plotado em gráfico.

3.5 CULTIVO CELULAR

A linhagem de leucemia basofílica RBL-2H3, proveniente da *American Type Tissue Culture Collection, ATCC* (Manassas, USA), foi utilizada para o ensaio de influxo de cálcio. A linhagem foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo estreptomicina/penicilina (10 mg/mL) e suplementada com 10 % de soro fetal bovino, em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂.

3.6 INFLUXO DE CÁLCIO

Foram utilizadas 1×10^8 células RBL-2H3 para este experimento. As células foram coletadas do cultivo utilizando Tripsina, lavadas com Tyrode's Buffer (NaHCO₃ (12 mM), NaCl (127 mM), KCl (5 mM), NaH₂PO₄ (0.5 mM), MgCl₂ (1 mM), Glucose (5 mM) and Hepes (10 mM)), duas vezes. Em seguida, foram incubadas com Fluo-4 (5 µM) em ácido plurônico (0,01 %) por 30 minutos a 37 °C. As células foram lavadas duas vezes com Tyrode's Buffer para desesterificação, em temperatura ambiente, por 30 minutos. Foram pipetados 50 µL da solução com células em uma placa escura de 96 poços, em triplicata para os tempos analisados. Três grupos foram analisados, um controle negativo utilizando 50 µL de PBS, e dois grupos com concentrações diferentes da toxina LiRecTCTP (50 µL de TCTP 50 µg/mL e TCTP 100 µg/mL), por poço. O influxo de cálcio foi medido utilizando um fluorímetro (TECAN), sendo realizada leituras nos tempos 0, 5, 15, 30 e 60 minutos. Os resultados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism 7.02*.

3.7 DERMONECROSE *IN VIVO*

Esse experimento foi realizado com os coelhos (CEUA/UFPR nº 1183) e espaço cedidos pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos/PR).

Os coelhos foram tricotomizados e as aplicações das amostras subcutâneas (para simular a picada da aranha-marrom) feitas no dorso do animal, em duplicata. Foram utilizados controles positivo (toxina LiRecDT1, 1 µg), negativo (proteína recombinante inativa, *Green Fluorescent Protein*, GFP, 20 µg) e veículo (PBS). A LiRecTCTP foi aplicada em concentrações de 10 e 20 µg, isoladamente, e nas mesmas concentrações misturadas à LiRecDT1 (1 µg). Em seguida, a pele do animal foi fotografada nos tempos 0, 3, 6 e 24h. Ao final das 24 horas amostras de 1x1cm foram colhidas e conservadas em ALFAC (álcool etílico 85%, formaldeído 10%, ácido acético 5%), para confecção de lâminas histológicas em laboratório parceiro.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste projeto foram submetidos à análise estatística, sendo as repetições e o tratamento avaliados (replicatas técnicas e biológicas). Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o *software Graphpad Prism 7.02*. A significância foi definida como * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$. Para análise da densitometria de bandas foi utilizado o *software ImageJ*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LIRECTCTP

O gel SDS-PAGE com as amostras em condições redutoras com cada etapa do processo de expressão e purificação asseguram que a proteína foi expressa e purificada de acordo com o esperado (figura 5). É possível observar a banda na altura

relacionada à proteína TCTP (23 kDa) na amostra retirada antes da indução (T0 - linha 1) e o aumento desta banda após a indução por IPTG 100mM (Ti - linha 2). Após a lise das células, a proteína se encontra solúvel no sobrenadante (linha 3). Na última coluna (linha 4) a presença somente da banda referente à TCTP, após a purificação, indica que a proteína está com alto grau de pureza. Segundo Sade (2009), a cromatografia em resina Ni²⁺-NTA agarose, resulta em um produto com até 90% de pureza. A análise em SDS-PAGE é um bom indicador, pois ajuda a entender se todas as etapas estão ocorrendo com sucesso. O gel permite evidenciar problemas durante o processo de produção e purificação, ocasionando a perda da proteína, além de ser possível verificar a presença de contaminantes.

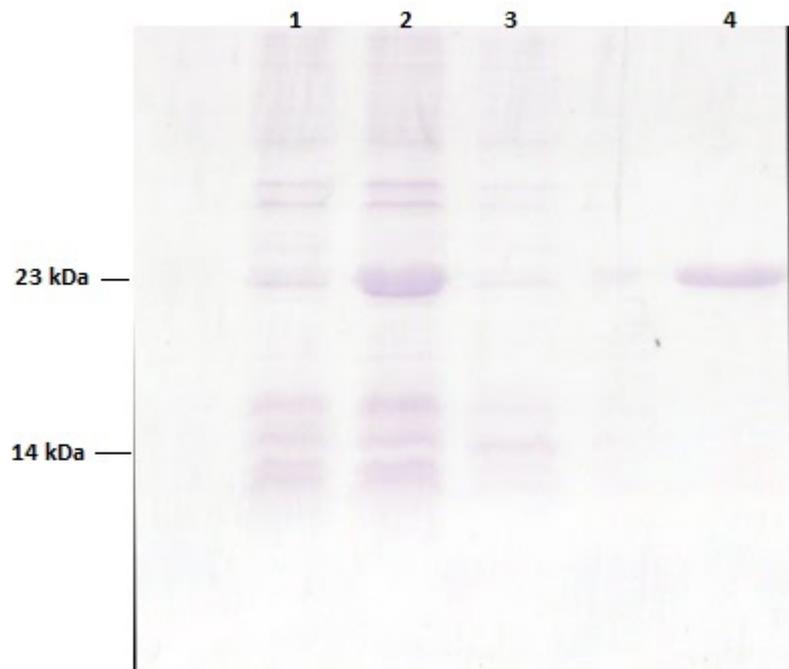


Figura 5: Gel SDS-PAGE com amostras da expressão de LiRecTCTP: T0 (1), Ti (2), sobrenadante (3), proteína purificada (4).

Durante o desenvolvimento do projeto, houve dificuldade em purificar a proteína e, após diversas tentativas, foi obtido o resultado esperado (proteína pura) ao substituir o protocolo de Purificação Híbrida pela Purificação Nativa. A Purificação Híbrida consiste na desnaturação, utilizando tampões com ureia, e renaturação da proteína, em tampões com a ausência de ureia, e sua desvantagem está relacionada à possibilidade da renaturação em conformação diferente da nativa (SADE, 2009). Durante as tentativas de expressão utilizando este protocolo, a amostra de resina após a purificação foi corrida em gel e foi identificado a presença da proteína ligada à resina, sendo que, mesmo após o aumento da concentração de imidazol nos tampões de lavagem e eluição, a proteína permanecia ligada. A hipótese foi que a proteína, ao renaturar de forma incorreta, não conseguiria se desligar da resina, impedindo a sua eluição. Dessa forma tentou-se a Purificação Nativa, como sugerido por Sade (2009), para evitar a renaturação incorreta da proteína, o que gerou um resultado satisfatório e menor possibilidade de conformações incorretas, ainda que permitissem a solubilidade da proteína recombinante.

4.2 DICROÍSMO CIRCULAR

O pico de elipticidade molar (figura 6) indica a presença de estruturas α -hélice, e a deconvolução (Tabela 1) revela que estas estruturas compõem 8,85% da proteína, além de 33,61% de folhas- β . Os 57,54% indicadas como “outros” na deconvolução referem-se às estruturas não secundárias. O pico de elipticidade molar pode ser maior ou menor, e é proporcional à quantidade de α -hélices presentes na proteína. Este resultado está de acordo com o encontrado por Rid e colaboradores (2009), que descrevem a presença de 8 folhas- β e 2 α -hélices. O dicróismo circular garante ainda a solubilidade da proteína pois, caso estivesse insolúvel, suas estruturas secundárias não seriam observadas. Segundo Bommer e Thiele (2003), a TCTP é uma proteína

altamente conservada nos eucariotos, dessa forma é possível comparar a estrutura da TCTP com outras já descritas na literatura, ainda que expressa por diferentes organismos. Esta comparação foi feita por Rid e colaboradores (2009), que descreveram a estrutura da TCTP expressa em *Alternaria alternata*, uma espécie de fungo que infecta folhas, utilizando como base o modelo de TCTP de *Schizosaccharomyces pombe* (levedura) e TCTP humana determinado por espectroscopia RMN.

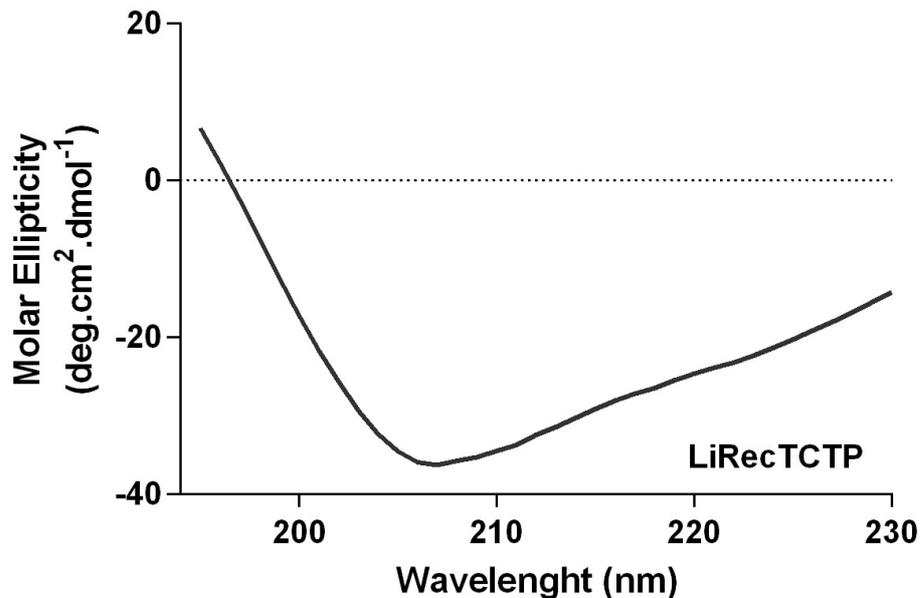


Figura 6: Gráfico do dícroísmo circular da LiRecTCTP.

CD DECONVOLUTION (%)			
PROTEIN	α -HELIX	β -STRAND	OTHERS
LiRecDTCTP	8.85 %	33.61 %	57.54 %

Tabela 1: Porcentagens de estruturas secundárias presentes na LiRecTCTP.

4.3 INFLUXO DE CÁLCIO

O resultado para os experimentos de influxo de cálcio foi estatisticamente relevante e demonstrou a atividade da LiRecTCTP no aumento do influxo de cálcio celular, como observado no gráfico abaixo (figura 7). Este efeito pode ser relacionado à atividade histaminérgica da proteína. O aumento do influxo de cálcio observado foi dose-dependente, sendo notável um pico no tempo de 15 minutos. No controle negativo (PBS) não foram observadas alterações, como era esperado, garantindo a confiabilidade do ensaio. Nas células humanas, o receptor de histamina H1 quando ativado, estimula as vias sinalizadoras de fosfolípide inositol, que têm por produto o inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3) e do diacilglicerol (DAG), e estes levam ao aumento do cálcio intracelular (CRIADO et al., 2010). A síntese e liberação de cálcio são realizadas por diferentes células, sendo uma delas os basófilos, por isso neste experimento foi utilizada a linhagem celular RBL-2H3, que é uma linhagem de leucemia basofílica de *Rattus norvegicus* (MULENGA et al., 2003).

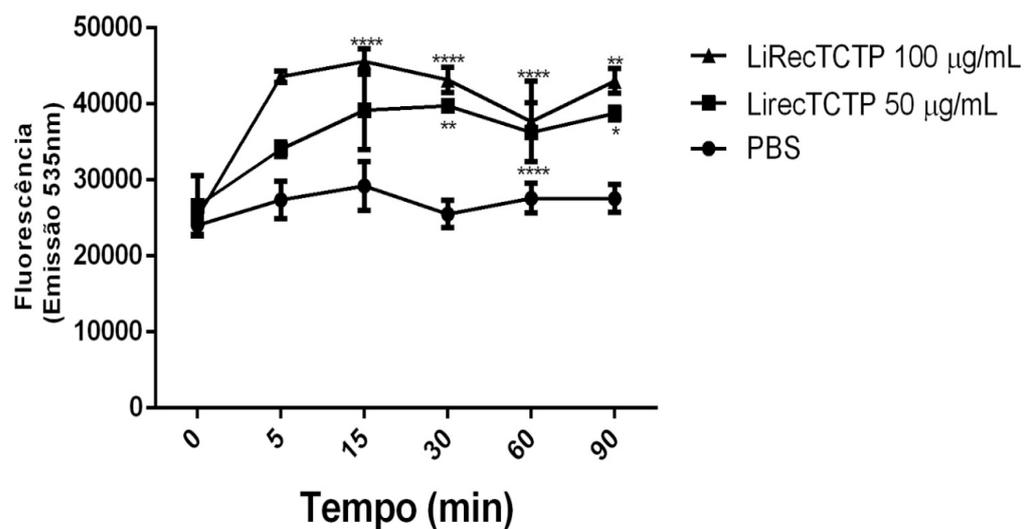


Figura 7: Gráfico da avaliação de influxo de cálcio intracelular na ausência e presença de LiRecTCTP.

4.4 DERMONECROSE

Neste ensaio em coelhos foi observado o desenvolvimento de edema, eritema e espalhamento gravitacional, esperados nas aplicações com LiRecTCTP, sendo relacionado com seu papel no processo inflamatório (figura 8). Ocorreu aumento progressivo dos sinais clínicos, que é pouco perceptível após 3 horas de aplicação, mas bem nítido a partir das 6 horas, com efeito ainda maior no tempo final (24 horas). Além disso, os sinais clínicos também são dependentes da concentração da toxina, o que pode ser notado pelo edema e eritema mais evidentes na aplicação com a maior concentração da proteína recombinante em relação a menor concentração. Estes resultados estão de acordo com o relatado por Sade e colaboradores (2012), que perceberam que a LiRecTCTP altera a permeabilidade vascular *in vivo*, além de aumentar o edema, sendo seu efeito tempo e concentração-dependentes.

A presença de lesão dermonecrotica (controle positivo) é resultante da aplicação da toxina recombinante LiRecDT1, e está de acordo com o que é descrito por Vuitika e colaboradores (2016). A inoculação desta toxina dermonecrotica é capaz de gerar a dermonecrose característica do loxoscelismo. Há um aumento da lesão, com presença de “placa marmórea”, região esbranquiçada que é resultado da isquemia no tecido lesionado. Não foi percebida nenhuma alteração no local de inoculação do controle negativo, a proteína recombinante GFP, que foi expressa no mesmo sistema heterólogo que a LiRecTCTP, garantindo que o sistema de expressão não está influenciando os resultados. As regiões dos coelhos nas quais foi injetada LiRecTCTP apresentaram eritema e a injeção combinada de LiRecTCTP com LiRecDT1 levou a um aumento do edema, concentração dependente. Os ensaios de dermonecrose em coelhos, demonstraram o efeito da LiRecTCTP no envenenamento, participando no processo inflamatório decorrente do loxoscelismo, assim como sugerido por Sade e colaboradores (2012). O estudo histológico das lesões irá

contribuir para a avaliação dos efeitos *in vivo* da LiRecTCTP e de sua atuação conjunta e sinérgica com a toxina dermonecrotica.

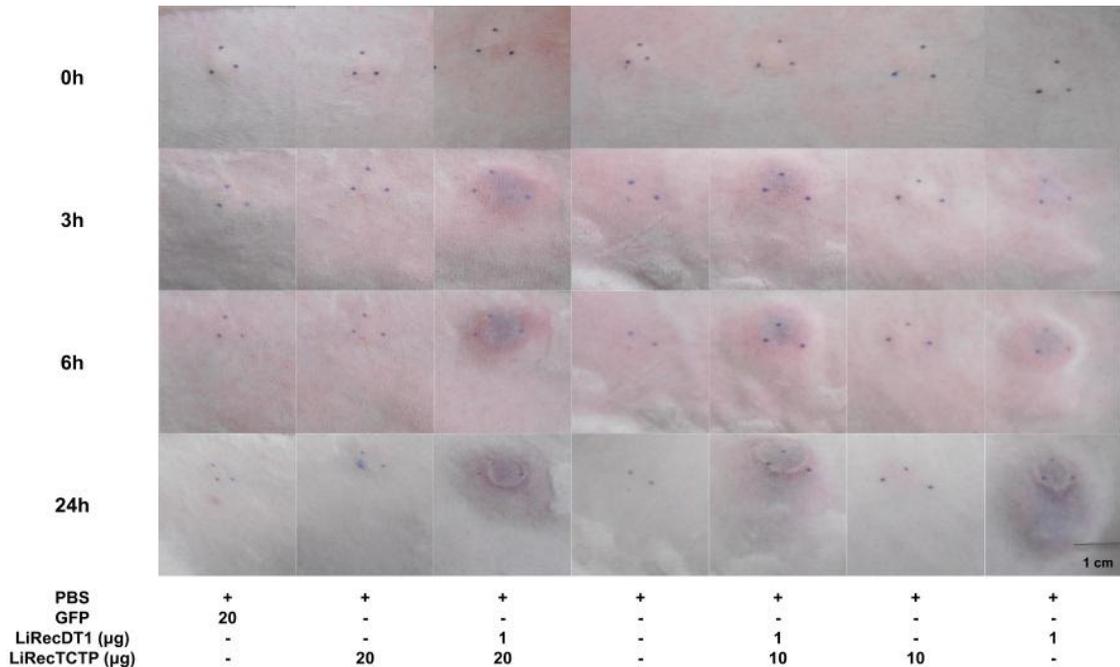


Figura 8: Prancha contendo as imagens da pele dos coelhos durante o ensaio de dermonecrose, com os pontos de inoculação das amostras ao longo do tempo: logo após a inoculação 0 h, 3 h, 6 h e 24 h.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos contribuem para compreensão do papel da TCTP no contexto loxoscélico, principalmente em relação a sua atividade histaminérgica *in vivo* e contribuição para o processo de inflamação exacerbado responsável pelos efeitos deletérios do envenenamento, sugerindo possibilidades terapêuticas e biotecnológicas. A TCTP é uma proteína com diversas atividades biológicas a serem exploradas, mas no contexto loxoscélico seria relevante estudar a inibição dessa proteína a fim de reduzir a inflamação e disseminação de toxinas a partir da picada. Cabe ressaltar que estes resultados fazem parte do artigo “TCTP from *Loxosceles*

intermedia (brown spider) venom contributes to the allergic and inflammatory response of Cutaneous Loxoscelism”, no qual Kamila Moreno é co-autora.

REFERÊNCIAS

AMSON, Robert; PECE, Salvatore; LESPAGNOL, Alexandra; VYAS, Rajesh; MAZZAROL, Giovanni; TOSONI, Daniela; COLALUCA, Ivan; VIALE, Giuseppe; RODRIGUES-FERREIRA, Sylvie; WYNENDAELE, Jessika. Reciprocal repression between P53 and TCTP. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 91-99, 11 dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2546>.

BOIA-FERREIRA, M; BASÍLIO, A B; HAMASAKI, A e; MATSUBARA, F H; APPEL, M H; COSTA, C R V da; AMSON, R; A TELERMAN,; CHAIM, O M; VEIGA, S s. TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 117, n. 5, p. 656-665, 27 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.230>.

BOIA-FERREIRA, Marianna; MORENO, Kamila G.; BASÍLIO, Alana B. C.; SILVA, Lucas P. da; VUITIKA, Larissa; SOLEY, Bruna; WILLE, Ana Carolina M.; DONATTI, Lucélia; BARBARO, Katia C.; CHAIM, Olga M.. TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 1489-0, 22 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8121489>.

BOMMER, Ulrich-Axel; THIELE, Bernd-Joachim. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 379-385, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00213-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00213-9).

BOMMER, Ulrich-Axel. The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: biological functions and regulation. **Results And Problems In Cell Differentiation**, [S.L.], p. 69-126, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-67591-6_4.

CHAIM, Olga Meiri; TREVISAN-SILVA, Dilza; CHAVES-MOREIRA, Daniele; WILLE, Ana Carolina M.; FERRER, Valéria Pereira; MATSUBARA, Fernando Hitomi; MANGILI, Oldemir Carlos; SILVEIRA, Rafael Bertoni da; GREMSKI, Luiza Helena; GREMSKI, Waldemiro. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: tools for biological purposes. **Toxins**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 309-344, 22 mar. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins3030309>.

CRIADO, Paulo Ricardo, et al. **Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos**. An Bras Dermatol. 2010;85(2):195-210.

FAUSTINO-ROCHA, Ana I. et al. Antihistamines as promising drugs in cancer therapy. **Life Sciences**, [s.l.], v. 172, p.27-41, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.12.008>.

GREMSKI, Luiza Helena; SILVEIRA, Rafael Bertoni da; CHAIM, Olga Meiri; PROBST, Christian Macagnan; FERRER, Valéria Pereira; NOWATZKI, Jenifer; WEINSCHUTZ, Hellen Chris; MADEIRA, Humberto Maciel; GREMSKI, Waldemiro; NADER, Helena Bonciani. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 2403, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c004118a>.

GUIMARÃES, Aline Barbosa. Análise peptidômica comparativa das **peçonhas de duas espécies de aranha-marrom: *Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia***. 2009. 77 f., il. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade de Brasília, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2009.

MACDONALD, S. M. et al. **Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor**. *Science*, v. 269, n. 5224, p. 688-90, 1995.

MULENGA, Albert; MACALUSO, Kevin R; A SIMSER, Jason; AZAD, Abdu F. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 911-919, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748\(03\)00097-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748(03)00097-3).

PALUDO, Katia Sabrina; BISCAIA, Stelée Marcela Petris; CHAIM, Olga Meiri; OTUKI, Michel Fleith; NALIWAIKO, Katya; DOMBROWSKI, Patrícia Andréia; FRANCO, Célia Regina Cavichiolo; VEIGA, Silvio Sanches. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 149, n. 3, p. 323-333, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.009>.

Portal da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. **Aranha-Marrom**. Disponível em <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Aranha-marrom#>> Acesso em 05 de julho 2020.

RID, Raphaela; ÖNDER, Kamil; MACDONALD, Susan; LANG, Roland; HAWRANEK, Thomas; EBNER, Christof; HEMMER, Wolfgang; RICHTER, Klaus; SIMON-NOBBE, Birgit; BREITENBACH, Michael. *Alternaria alternata* TCTP, a novel cross-reactive ascomycete allergen. **Molecular Immunology**, [S.L.], v. 46, n. 16, p. 3476-3487, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2009.07.024>.

SADE, Youssef Bacila. **Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) a**

partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de aranha-marrom (Loxosceles intermedia). 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SADE, Youssef B.; BÓIA-FERREIRA, Marianna; GREMSKI, Luiza H.; SILVEIRA, Rafael B. da; GREMSKI, Waldemiro; SENFF-RIBEIRO, Andrea; CHAIM, Olga M.; VEIGA, Silvio S.. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 170-177, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.013>.

SILVA, Paulo Henrique da; SILVEIRA, Rafael Berton da; APPEL, Márcia Helena; MANGILI, Oldemir Carlos; GREMSKI, Waldemiro; VEIGA, Silvio Sanches. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, [S.L.], v. 44, n. 7, p. 693-709, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>.

TAMBOURGI, Denise V.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, Rute M.; BERG, Carmen W. van Den. Loxoscelism: from basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, [S.L.], v. 56, n. 7, p. 1113-1119, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>.

TELERMAN, Adam; AMSON, Robert. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 206-216, 30 jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2589>.

VUITIKA, L.; CHAVES-MOREIRA, D.; CARUSO, I.; LIMA, M.A.; MATSUBARA, F.H.; MURAKAMI, M.T.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.s.; CORONADO, M.A.; NADER, H.B.. Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: biochemical and biological features. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1861, n. 9, p. 970-979, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.05.009>.

ANEXO 1 – ARTIGO



Article

TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism

Marianna Boia-Ferreira ¹, Kamila G. Moreno ¹, Alana B. C. Basilio ¹, Lucas P. da Silva ¹, Larissa Vuitika ¹, Bruna Soley ², Ana Carolina M. Wille ³, Lucélia Donatti ¹, Katia C. Barbaro ⁴, Olga M. Chaim ^{1,5}, Luiza Helena Gremski ¹, Silvio S. Veiga ¹ and Andrea Senff-Ribeiro ^{1,*}

¹ Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-980, PR, Brazil; marianna.boia@gmail.com (M.B.-F.); kamilamoreno7@gmail.com (K.G.M.); alana_abcb@hotmail.com (A.B.C.B.); spedrosa.lucas@gmail.com (L.P.d.S.); larissavuitika2@gmail.com (L.V.); donatti@ufpr.br (L.D.); olgachaim@ufpr.br or ochaim@ucsd.edu (O.M.C.); luiza_hg@yahoo.com.br (L.H.G.); veigass@ufpr.br (S.S.V.)

² Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-980, PR, Brazil; brunasoley@gmail.com

³ Department of Structural and Molecular Biology, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa 84030-900, PR, Brazil; anacarolina.wille@yahoo.com.br

⁴ Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, São Paulo 05503-900, SP, Brazil; katiacarbaro@hotmail.com

⁵ Department of Pharmacology, School of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093, USA

* Correspondence: senffribeiro@gmail.com or senffribeiro@ufpr.br; Tel.: +55-41-3361-1779

Received: 22 August 2019; Accepted: 10 November 2019; Published: 22 November 2019



Abstract: LiTCTP is a toxin from the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) family identified in *Loxosceles* brown spider venoms. These proteins are known as histamine-releasing factors