

PARTICIPAÇÃO DE AMINOPEPTIDASES RENAIIS E ALTERAÇÕES NO SISTEMA DE DETOXIFICAÇÃO DO HEME DURANTE O ENVENENAMENTO POR *Lonomia obliqua*

INTRODUÇÃO

Lonomia obliqua (Lepidoptera: Saturniidae) é uma espécie de mariposa cujo estágio larval é responsável pelo lonomismo, uma forma de envenenamento causado pelo contato da pele com as espículas do animal. Contatos acidentais com a taturana é um problema de saúde pública recorrente desde os anos 80, especialmente nas regiões sul e sudeste brasileiras, visto as altas taxas de incidência e a severidade das consequências clínicas. Vítimas envenenadas apresentam um quadro clínico de coagulação intravascular disseminada, seguida por hemorragia sistêmica que, frequentemente, evolui para uma lesão renal aguda (LRA), caracterizada como a principal causa de morte nesses casos.

A fim de melhor compreender os prováveis mecanismos de nefrotoxicidade, o presente estudo procura, por meio da análise proteômica da urina, alterações em rotas moleculares e possíveis biomarcadores de LRA.

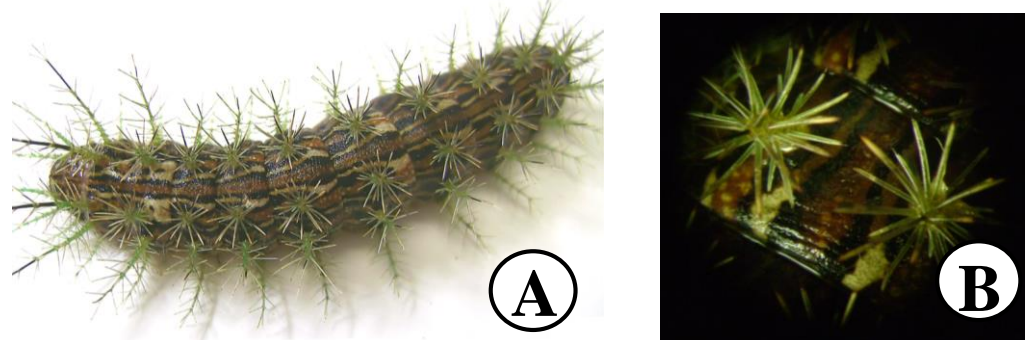


Fig. 1. A Lagarta *Lonomia obliqua*. A. *L. obliqua* (6º instar). B. Detalhe das espículas da *L. obliqua*. (PINTO, AFM *et al* (2010). *Toxicol* 56 (7), 1103-12)

METODOLOGIA

Ratos Wistar machos foram injetados com veneno de *L. obliqua* (1,5 mg / kg, via s.c) ou NaCl 0,9 % e distribuídos em gaiolas metabólicas. Após 24h, a urina foi obtida e o conjunto de proteínas diferencialmente reguladas foi analisado utilizando tecnologia de cromatografia multidimensional (MudPIT) seguida de análise de massas (MS/MS) em um espectrômetro OrbiTRAP. Então, as atividades de uma série de aminopeptidases e serino-proteinasas foram determinadas na urina.

O protocolo experimental foi aprovado no CEUA-HCPA (número 160054).

RESULTADOS

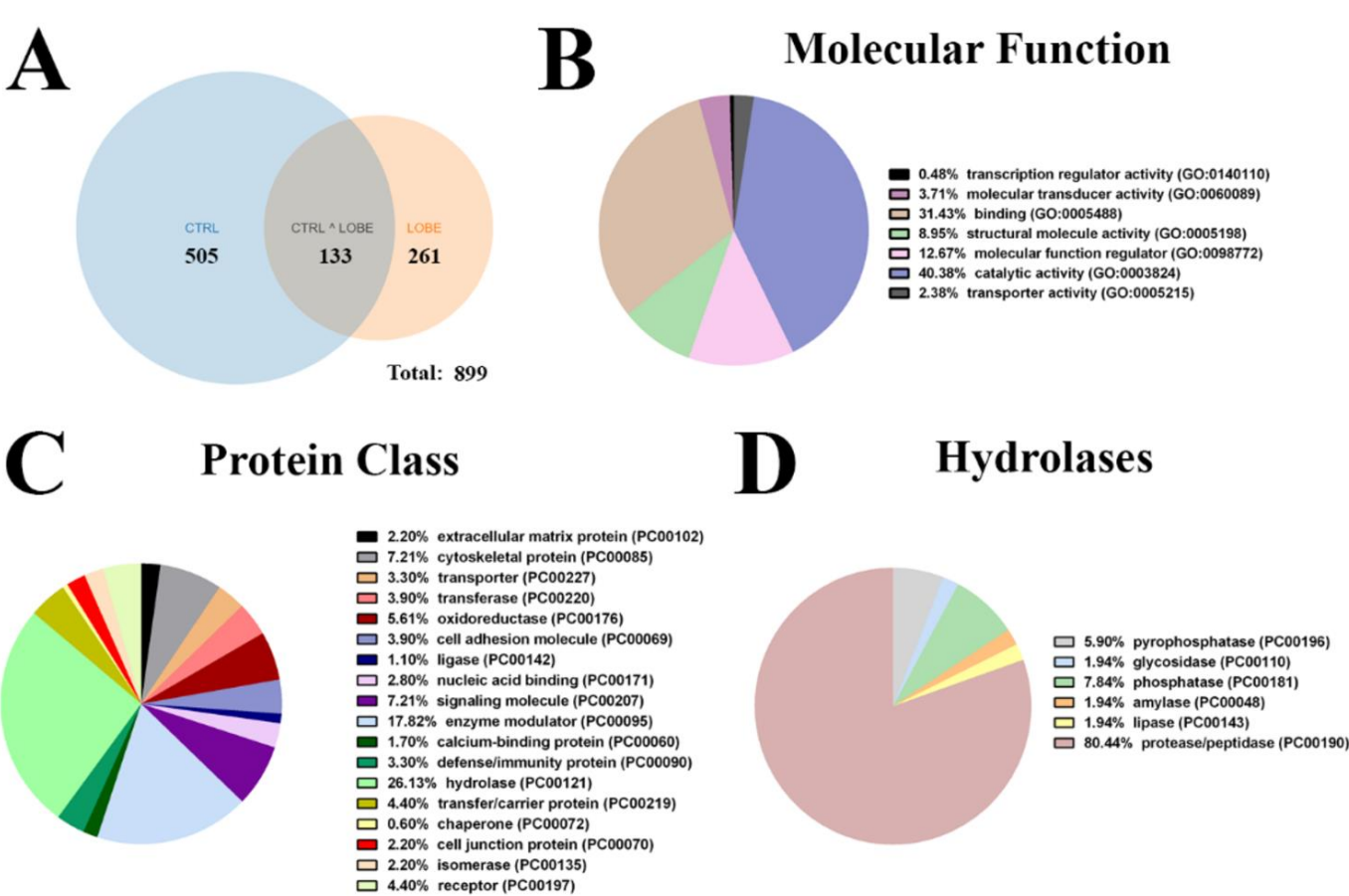


Fig. 2. Análise Proteômica da Urina. (A) Número total de proteínas identificadas na urina de animais controles (CTRL) e envenenados (LOBE). CTRL+LOBE corresponde às proteínas comuns a ambos os grupos. (B) Função Molecular desempenhada pelas proteínas identificadas na urina dos ratos envenenados. (C) Descrição funcional das Classes de Proteínas identificadas no proteoma dos animais injetados com veneno. (D) Descrição funcional detalhada da classe de proteínas hidrolases.

Fig. 3. Rotas Moleculares associadas às proteínas identificadas na urina de animais envenenados. (A) As proteínas identificadas na urina destes animais foram categorizadas nas doze principais vias moleculares. Foram identificadas rotas associadas a vaso ativação, coagulação sanguínea, fibrinólise, sinalização adrenérgica e serotoninérgica. (B) Uma visão detalhada das rotas relacionadas a coagulação sanguínea, fibrinólise e sinalização de cininas identificadas na urina de ratos injetados com veneno.

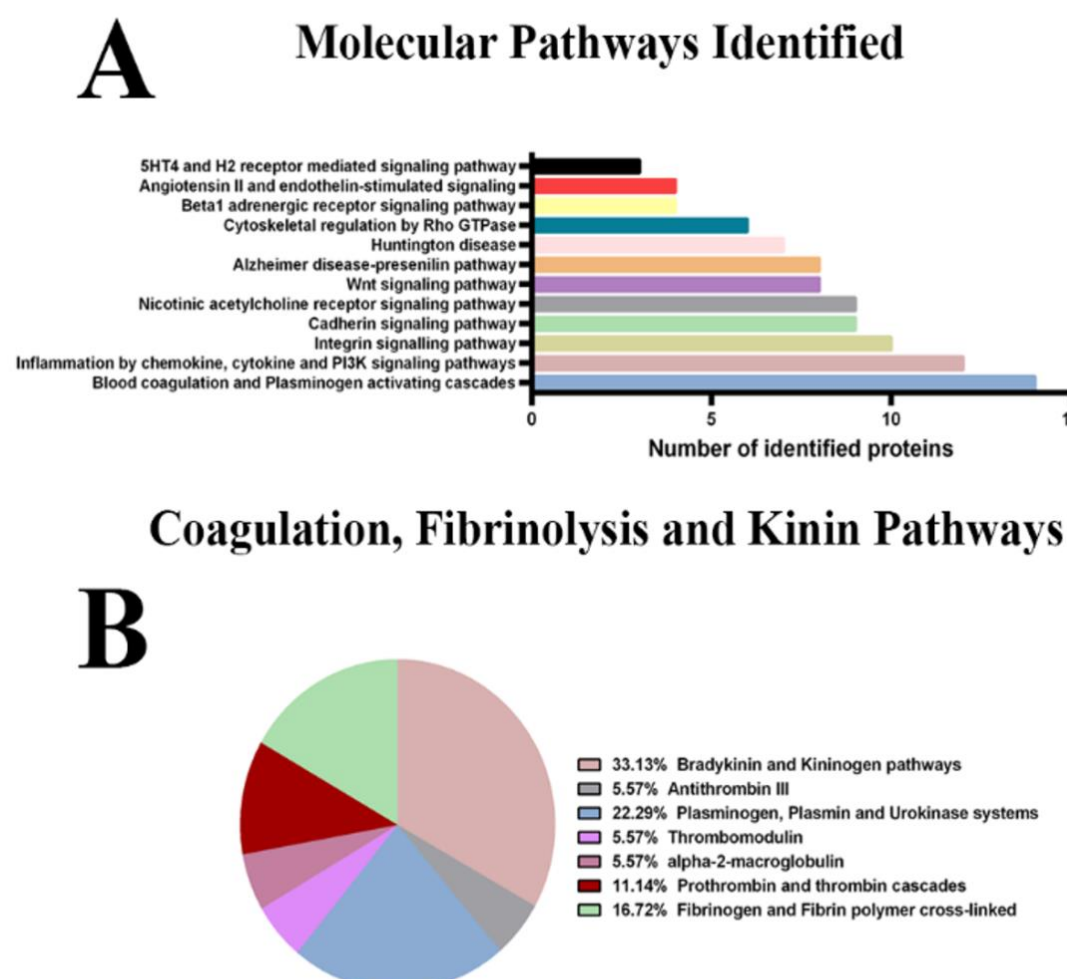


Tabela 1: Peptidases identificadas exclusivamente na urina de animais envenenados por análise proteômica.

Accession number	Protein name	Function
IP100320862.7	Aminopeptidase N (APN - Kidney Zn peptidase)	Present in kidney proximal tubules. Hydrolyzes Lys-BK generating BK. Hydrolyzes Ang III generating Ang IV
IP100327398.1	Glutamyl aminopeptidase (Aminopeptidase A)	Main enzyme that initiates the breakdown of Ang II into Ang III
IP100208422.2	Dipeptidyl peptidase 4	Hydrolyzes neuropeptide Y, having a vasodilator effect. Hydrolyzes hemorphins releasing and activating APN
IP100201592.1	Kallikrein - 7	Proinflammatory enzyme. Hydrolyzes HMWK generating BK. Activates the contact system of blood coagulation
IP100201593.3	Kallikrein - 8	Proinflammatory enzyme. Hydrolyzes HMWK generating BK. Activates the contact system of blood coagulation
IP100209517.1	Kallikrein - 9	Proinflammatory enzyme. Hydrolyzes HMWK generating BK. Activates the contact system of blood coagulation
IP100766750.1	Kallikrein - 10	Proinflammatory enzyme. Hydrolyzes HMWK generating BK. Activates the contact system of blood coagulation
IP100421761.4	Kallikrein - 11	Proinflammatory enzyme. Hydrolyzes HMWK generating BK. Activates the contact system of blood coagulation
IP100201595.1	Kallikrein - 12	Proinflammatory enzyme. Hydrolyzes HMWK generating BK. Activates the contact system of blood coagulation
IP100210872.5	Meprin A	Hydrolyzes procollagen-1, leading to collagen deposition and fibrosis. Hydrolyzes amyloid precursor protein.
IP100212697.1	Napsin	Present in kidney proximal tubules involved in protein catabolism. Marker of papillary renal cell carcinoma.
IP100844832.1	Urokinase-type plasminogen activator	Hydrolyzes plasminogen releasing active plasmin, a fibrinolytic enzyme
IP100421525.1	Cathepsin D	Proinflammatory enzyme released by neutrophils. Hydrolyzes haemoglobin generating hemorphins
IP100212809.1	Cathepsin H	Proinflammatory enzyme released by neutrophils
IP100326070.3	Cathepsin L	Proinflammatory enzyme released by neutrophils
IP100212520.1	Matrix Metalloproteinase - 8	Matrix protease
IP100200747.1	Endothelin-converting enzyme 1	Endothelin generating enzyme, a vasoconstrictor agent

CONCLUSÕES

Segundo os dados obtidos, é possível afirmar que a lesão renal causada pelo envenenamento por *L.obliqua* é resultante da toxicidade envolvida nas alterações dos níveis de heme e hemoglobina, assim como por um desequilíbrio no sistema de metabolização/geração de cininas e angiotensinas.

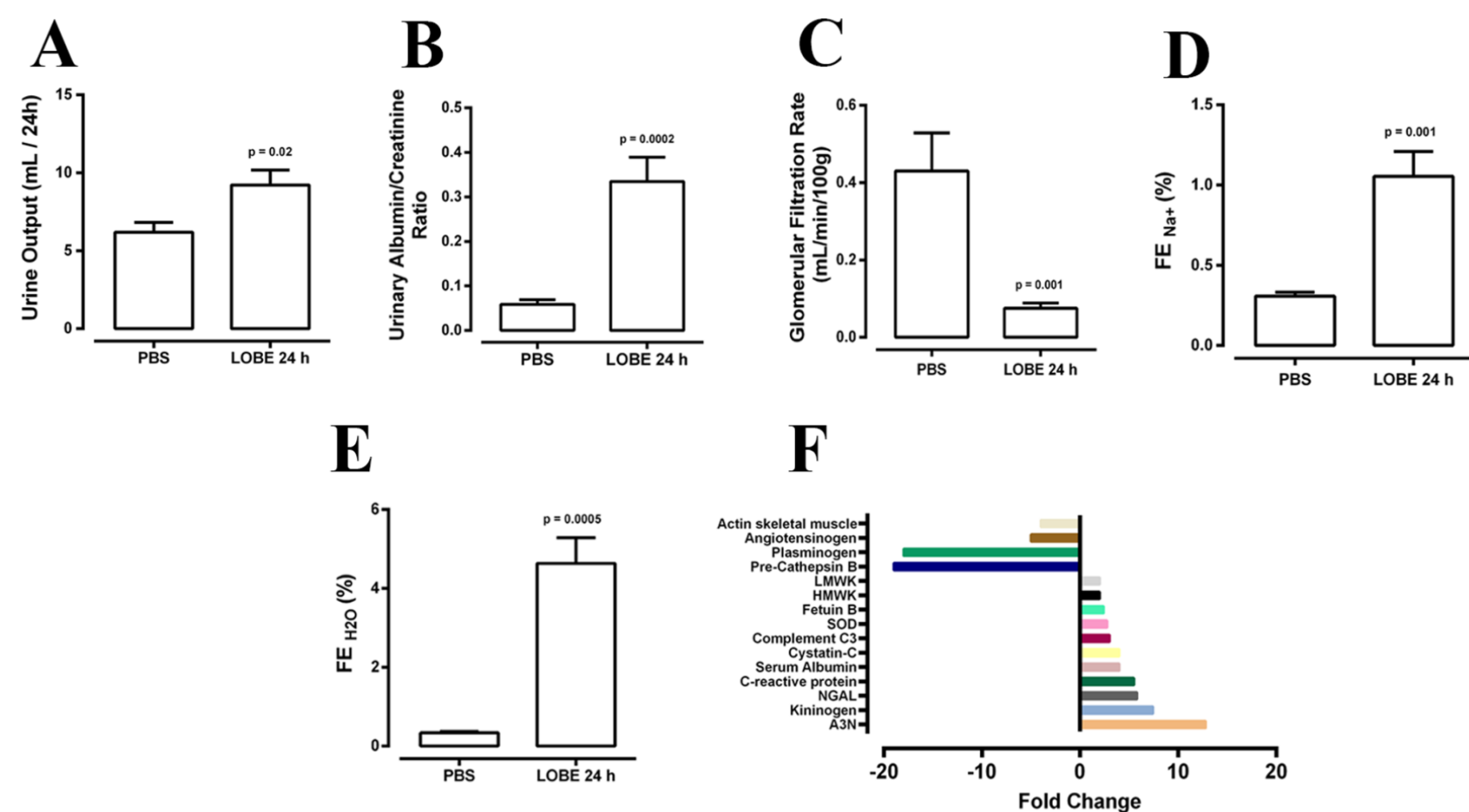


Fig. 4. Lesão renal induzida pelo envenenamento. (A) Quantidade de urina expelida em um período de 24h, comparando a excreção urinária dos animais envenenados com os controles. (B) Razão entre a quantidade de albumina e creatinina excretadas na urina de animais 24h depois da injeção com veneno de *L. obliqua*. (C) Taxa de filtração glomerular em grupos controles e envenenados. (D) Fração de sódio excretado na urina. (E) Fração de água excretada na urina. (F) Principais proteínas diferencialmente reguladas que foram identificadas na urina de animais envenenados por meio de análise proteômica. Números positivos indicam uma regulação positiva da expressão proteica, enquanto números negativos representam uma regulação negativa da expressão proteica. Diferenças estatísticas foram analisadas pelo t-test.

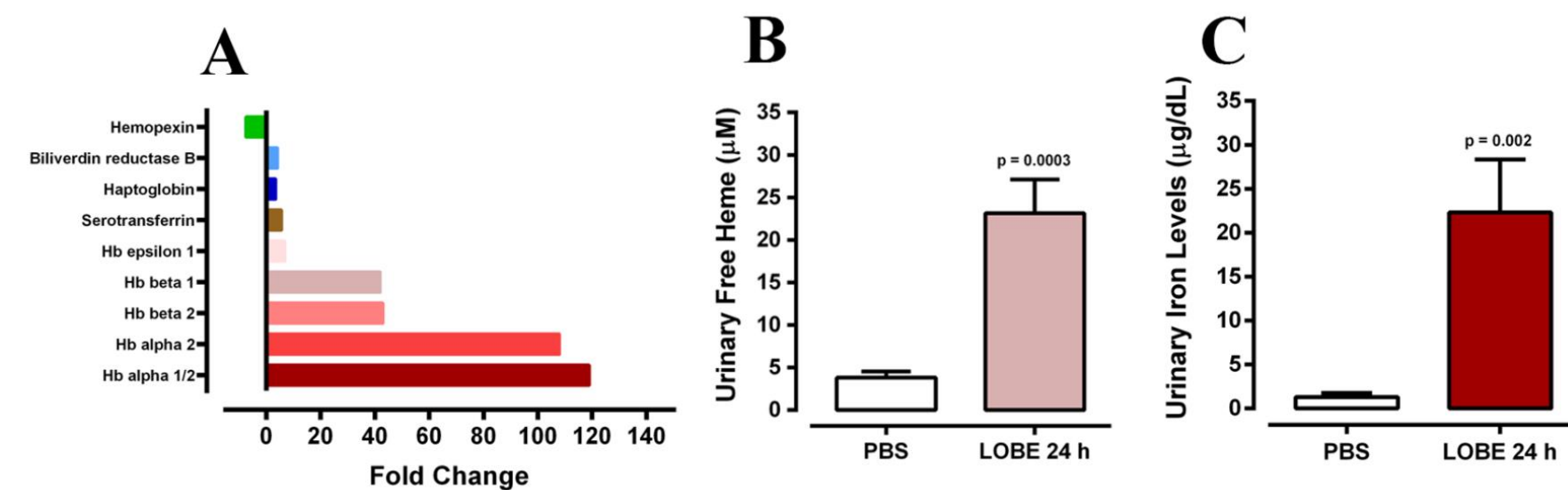


Fig. 5. Participação do sistema de detoxificação do heme/hemoglobina na IRA induzida pelo veneno de *Lonomia obliqua*. (A) Principais proteínas associadas ao sistema heme/hemoglobina que foram identificadas no proteoma na urina de ratos envenenados apresentam alterações em seus níveis quando comparadas com grupos controles. (B) Níveis de heme livre na urina de animais envenenados. (C) Níveis de ferro livre na urina de ratos injetados com LOBE. Diferenças estatística foram analisadas por t-test.

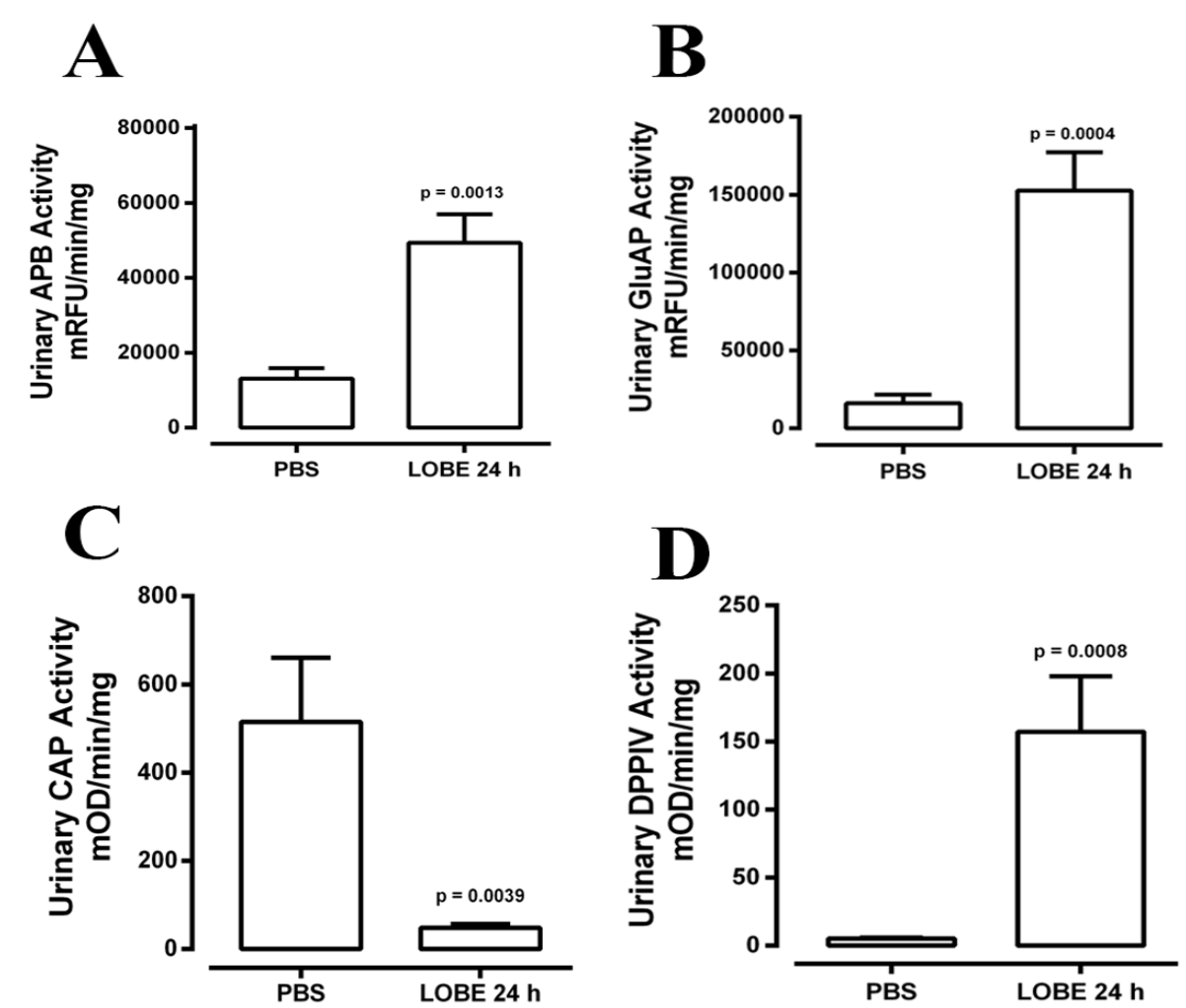


Fig. 6. Atividade de aminopeptidases envolvidas no metabolismo de peptídeos vasoativos presentes na urina. (A) Atividade da Aminopeptidase B (APB). (B) Atividade da Aminopeptidase A ou Glutamyl Aminopeptidase (APA ou GluAP). (C) Atividade da vasopressinase, ocitocinase ou cystil-aminopeptidase (CAP). (D) Atividade da Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV). Diferenças estatística foram analisadas por t-test.

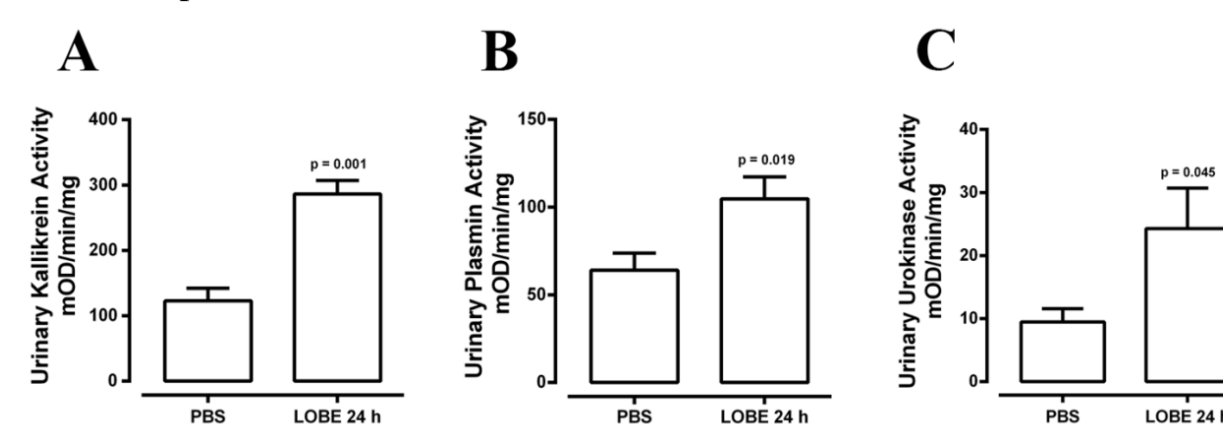


Fig. 7. Atividade de serino-proteinasas na urina. (A) Atividade de caliceína. (B) Atividade da plasmina. (C) Atividade da uroquinase. Diferenças estatística foram analisadas por t-test.

Referências:

- BERGER, M. *et al* (2012). In: *Renal Failure*, the facts.
PINTO, AFM *et al* (2010). *Toxicol* 56 (7), 1103-12
BERGER, M *et al* (2010). *Toxicol* 55 (1), 33-44.
BERGER, M *et al.*, (2015). *Arch. Toxicol.* 89 (3): 459-83



Supported by Capes, CNPq and FIPE-HCPA