

## NATTERINA-LIKE DE ZEBRAFISH É UMA MOLÉCULA IMPORTANTE PARA A ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA E DEFESA ANTI-BACTERIANA

Felipe Justiniano Pinto<sup>1</sup>; Aline Ingrid Andrade-Barros<sup>1</sup>; Mônica Lopes-Ferreira<sup>1</sup>; Carla Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunorregulação/Plataforma Zebrafish, LETA. Instituto Butantan. São Paulo, Brasil.

*felipe.pinto.esib@esib.butantan.gov.br; aline.barros@fundacaobutantan.org.br;*

*monica.lopesferreira@butantan.gov.br; carla.lima@butantan.gov.br*

Natterinas de *Thalassophryne nattereri* foram identificadas como as principais responsáveis pelos sintomas de dor, edema e necrose dos pescadores e banhistas acidentados. Recentemente, a família das Natterinas foi ampliada pela inclusão de 859 genes *natterina* ou *natterina-like* identificados em 331 espécies. Suas funções permanecem pouco elucidadas e estudos indicam seu papel na resposta imune inata. O *Danio rerio* (*zebrafish*) possui 10 genes que codificam 11 proteínas *Natterina-like*, e é um modelo organismo ideal para investigar funções de novos genes. Larvas de *zebrafish* de 24 horas pós-fertilização (hpf) selvagens (WT) ou depletadas do gene *loc795232* via CRISPR/Cas9 (KO) previamente estimuladas com Pam3CSK4 ou bloqueadas com MCC950 por 1 hora foram infectadas com a bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ST) por mais 2 horas. A infecção foi avaliada pela análise da mortalidade, defeito no desenvolvimento e alterações na atividade locomotora. Lisados proteicos obtidos foram utilizados para avaliar a atividade enzimática de caspase-a e a expressão da molécula adaptadora do inflamassoma ASC. Os resultados mostram que a imersão por até 2 h de larvas de 24 hpf com a ST é efetiva para induzir infecção caracterizada por mortalidade imediata e crescente até 72 h e com comportamento de hiperatividade locomotora. Além disso, a ativação do receptor TLR2, que subsequentemente leva à ativação transcricional de NLRP3 e pró-IL-1 $\beta$  dependente de NF- $\kappa$ B é fundamental para o controle da mortalidade induzida pela ST. Assim como a inibição da ativação do complexo inflamassoma por MCC950 pode levar à supressão da ativação autoproteolítica de caspase-1, sem a subsequentemente clivagem de IL-1 $\beta$ , promovendo assim maior mortalidade das larvas infectadas. Ainda, a expressão de ASC induzida pelas larvas para controle da infecção depende da *Natterina-like*, pois nas larvas KO a expressão estava comprometida. Podemos concluir que a *Natterina-like* é uma molécula importante para a ativação do inflamassoma, responsável por garantir uma resposta inflamatória eficiente e resistência à infecção bacteriana.

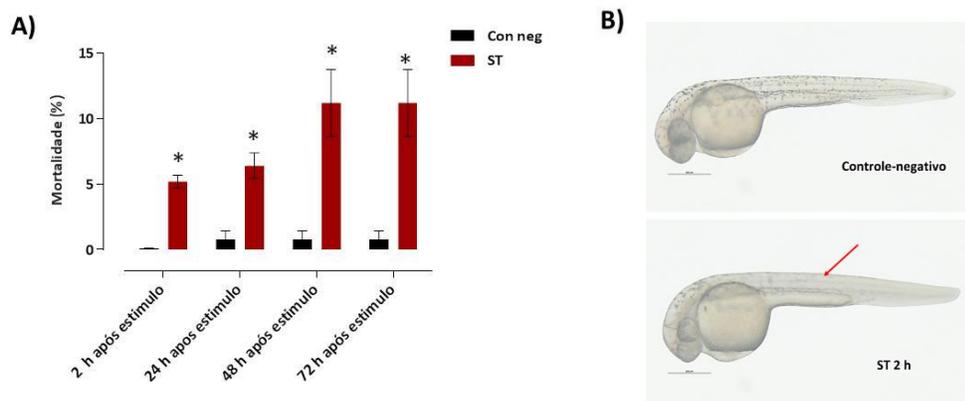
**Palavras-chave:** *Natterina-like*; Inflamassoma; *Zebrafish*.

**Introdução.** As Natterinas descobertas no veneno do *Thalassophryne nattereri* são as responsáveis pelos sintomas do envenenamento em humanos (Magalhães *et al.*, 2005; Lopes-Ferreira *et al.*, 2004). Recentemente novos membros dessa família de proteínas foram encontrados (Lima *et al.*, 2021) em 331 espécies totalizando 859 genes com funções ainda desconhecidas. O *zebrafish* (*Danio rerio*) possui 10 genes que codificam 11 proteínas *Natterina-like* e é um excelente modelo alternativo para investigar funções de proteínas. A *natterina-like* XP\_017212453.1 codificada pelo gene *loc795232* foi associada ao desenvolvimento embrionário (Seni-Silva *et al.*, 2022) e neste trabalho vem sendo estudada quanto à participação na defesa anti-bacteriana, especialmente na ativação do complexo inflamassoma.

**Materiais e métodos.** Larvas de *zebrafish* ( $n = 50$ ) de 24 hpf (WT) foram ou não estimuladas com Pam3CSK4 (#2201, Imgenex a 1  $\mu$ g/mL) ou bloqueadas com MCC950 (#17510, Cayman a 1  $\mu$ M) por 1 hora. Em seguida, foram ou não infectadas com a bactéria gram-negativa ST (#TLRL-

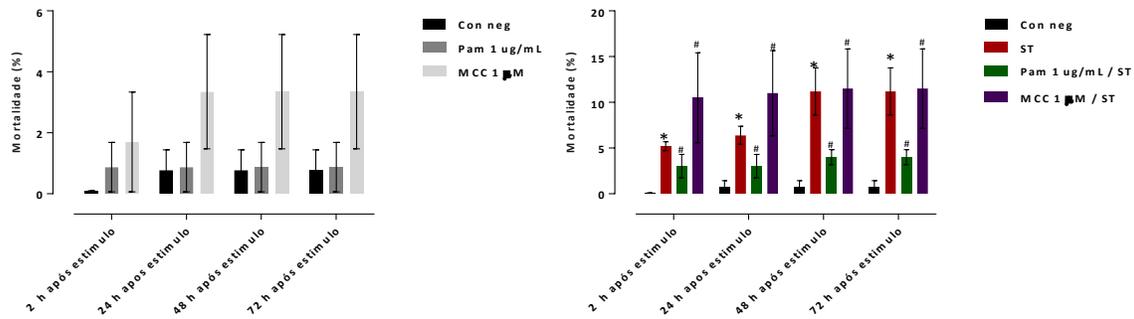
HKST2, Invivogen)  $10^6$  cels/mL por 2 horas. Larvas não estimuladas ou infectadas foram consideradas controle-negativo. A mortalidade e os defeitos morfológicos foram avaliados a cada 24 h em esteriomicroscópio Leica M205 (aumento 40x). O padrão locomotor foi monitorado após 72 h da infecção utilizando o ZebraLab™ versão 3.52 (Pisa, Italy, ViewPoint), por 32,5 minutos, 30 min de aclimação à luz e 5 ciclos de 1 s no escuro e 29 s à luz. Lisados proteicos foram obtidos para avaliar a atividade enzimática da caspase-a por ensaio colorimétrico (#K111-100, R&D Systems) com leitura de absorbância a 405 nm. Larvas de *zebrafish* ( $n = 50$ ) WT e KO (depletadas do gene *loc795232* por CRISPR/Cas9 em 0 hpf), decorionadas em 24 hpf e infectadas pela ST por 2 horas com ou sem tratamentos prévios foram avaliadas quanto à expressão proteica de ASC na forma dimérica por *western blot* com anticorpo anti-ASC de camundongo (#sc-514414; diluição 1:100) e um segundo anticorpo anti-IgG1 de camundongo HRP TrueBlot (#18-4015-82, E-Bioscience; diluição 1:2000) e revelados por quimiluminescência.

**Resultados e discussão.** A estimulação por 2 h com ST induziu 5,2% de mortalidade imediatamente ao período de incubação. A mortalidade aumentou para 6,4% após mais 24 h em relação a 0,8% de mortalidade observada nas larvas do grupo controle-negativo. Após 48 h a mortalidade alcançou um pico de 11,2% permanecendo assim por até 72 h após a infecção (Figura 1A). Também evidenciamos atraso no desenvolvimento da pigmentação nas larvas infectadas com a ST em comparação às larvas com pigmentação normal do grupo controle-negativo (Figura 1B).



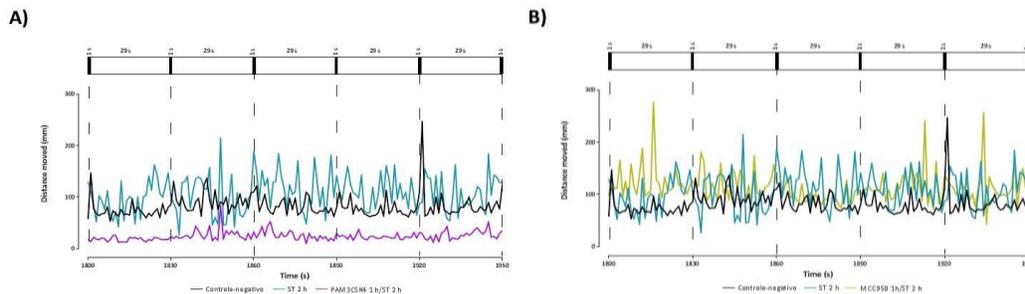
**Figura 1.** Efetividade da exposição por 2 h de larvas de *zebrafish* à infecção pela ST. Os grupos tiveram a mortalidade determinada imediatamente após infecção e a cada 24 h (A) as larvas foram analisadas quanto as alterações morfológicas (B). A seta vermelha indica atraso no desenvolvimento pela ausência de pigmentação nas larvas expostas à ST. As barras representam a média da mortalidade acrescida do desvio-padrão. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle-negativo respectivo

Investigamos o efeito do tratamento prévio das larvas com o lipopeptídeo triacilado sintético (Pam3CSK4) ou bloqueador do domínio ATPase do domínio NACHT de NLRP3, MCC950. A incubação por 2 h das larvas somente com os tratamentos não induziu mortalidade diferente da encontrada no grupo controle-negativo (Figura 2A). A mortalidade imediata após 2 h de incubação assim como a cada 24 h foi inibida pelo tratamento com Pam3CSK4, e ao contrário, o tratamento prévio com o MCC950 promoveu maiores taxas de mortalidade até 72 h após a infecção em comparação ao grupo infectado com a ST (Figura 2B).



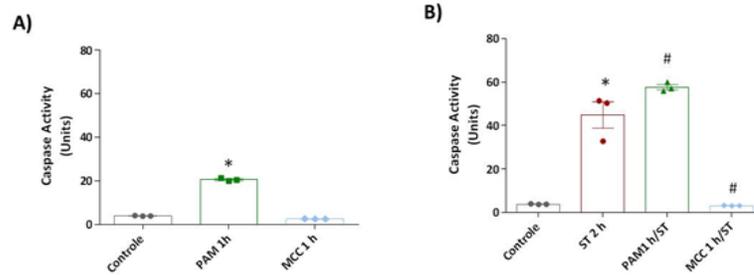
**Figura 2.** Papel do inflamassoma no controle da infecção induzida pela exposição por 2 h à ST. Grupos controle-negativo, Pam3CSK4 e MCC950 (A) e ST, Pam3CSK4/ST e MCC950/ST (B) tiveram a mortalidade determinada imediatamente após infecção e a cada 24 h. As barras representam a média da mortalidade acrescida do desvio-padrão. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle-negativo respectivo e # $p < 0,05$  em relação grupo-ST respectivo

Verificamos o papel da ativação do inflamassoma nas alterações na atividade locomotora nas larvas infectadas pela ST por 2 h. O padrão de atividade locomotora das larvas do grupo controle-negativo é caracterizado por uma hiperatividade imediata e robusta no comportamento locomotor durante o período de escuridão seguida de menor atividade durante o período de luz com uma grande distância total percorrida. O estímulo com ST por 2 h promoveu hiperatividade com uma grande distância total percorrida e inversão do padrão escuro/claro em relação ao comportamento locomotor das larvas do grupo controle-negativo, e as larvas tratadas previamente com Pam3CSK4 além de terem o padrão escuro/claro alterado pela infecção com ST apresentaram hipoatividade (Figura 3A). Já o grupo previamente tratado com MCC950 apresentou o padrão escuro/claro alterado pela infecção com ST com hiperatividade (Figura 3B).



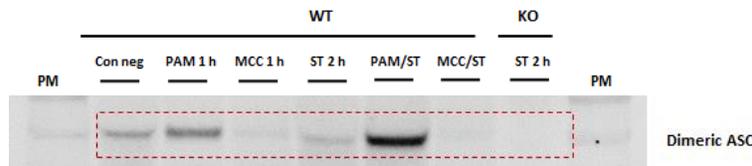
**Figura 3.** Alteração da atividade locomotora induzida pela exposição por 2 h com a ST. Larvas infectadas pela ST por 2 h, assim como os grupos controle-negativo ou tratados previamente com Pam3CSK4 (A) ou MCC950 (B) incubadas por 72 h. As linhas representam a distância percorrida pelas larvas a cada segundo durante o período de 2,5 min de teste após a aclimação.

O sistema imunológico identifica a ST por meio de seus PAMPs, como LPS (reconhecido pelos receptores TLR4), lipoproteínas (reconhecido pelos receptores TLR2/TLR1), flagelina e outros metabólitos, desencadeando a ativação do inflamassoma pelo sensor NLRP3 e a molécula adaptadora ASC, essenciais na depuração do patógeno. NLRP3 de *zebrafish* inicia a montagem clássica do inflamassoma para ativação de caspase-a e maturação IL-1 $\beta$  dependente de ASC (Li JY *et al.*, 2020). Larvas não infectadas ou tratadas apenas com MCC950 mostraram baixa atividade de *casp-a*. Larvas tratadas com Pam3CSK4 apresentaram atividade aumentada em 5 vezes (Figura 4A), enquanto as infectadas por ST obtiveram um aumento de 11 vezes em relação ao controle-negativo (Figura 4B). Grupos tratados com Pam3CSK4 exibiram maior atividade de *casp-a*, enquanto o tratado com MCC950 manteve níveis baixos após a infecção.



**Figura 4.** Ativação de caspase em larvas de zebrafish estimuladas com ST. Larvas infectadas por ST por 2 h (B), assim como os grupos controle-negativo ou tratados previamente com Pam3CSK4 ou MCC950 (A). As barras representam a média da atividade em unidades acrescida do desvio-padrão. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle-negativo e # $p < 0,05$  em relação grupo-ST

A proteína ASC constitutiva se oligomeriza após a complexação a NLRP3 e seus dímeros podem ser detectados após ativação. Detectamos uma expressão baixa de ASC dimérico (48 kDa) (Figura 5) nos grupos sem estímulo, tratado com MCC950 e estimulados pela ST por 2 h e ao contrário, aumentada expressão no grupo tratado com Pam3CSK4 1 h e principalmente no grupo tratado com Pam3CSK4 e infectado pela ST. Assim como a inibição da ativação do complexo inflamassoma por MCC950 impediu a sua expressão. Notavelmente, a ausência de *natterina-like* nas larvas KO impediu a expressão de ASC.



**Figura 5.** Ausência de *natterina-like* nas larvas KO impediu a expressão de ASC (48 kDa)

**Conclusão.** A Natterina-like é uma molécula importante para a ativação do inflamassoma NLRP3 dependente de ASC, responsável por garantir uma resposta inflamatória eficiente e resistência à infecção bacteriana.

**Agradecimentos.** A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (#2023/01659-8) e a Fundação Butantan (#001/0708/000.365/2023).

## Referências

- Li, JY; Wang, YY; Shao, T; Fan, DD; Lin, AF; Xiang, LX; Shao, JZ. The zebrafish NLRP3 inflammasome has functional roles in ASC-dependent interleukin-1 $\beta$  maturation and gasdermin E-mediated pyroptosis. *J Biol Chem.* Jan 24;295(4):1120-1141. 2020.
- Lima, C; Disner, GR; Falcão, MAP; Seni-Silva, AC; Maleski, ALA; Souza, MM; Tonello, MCR; Lopes-Ferreira, M. The Natterin protein family diversity: a review on phylogeny, structure, and immune function. *Toxins.* 13, 538.
- Lopes-Ferreira, M; Emim, JA; Oliveira, V; Puzer, L; Cezari, MH; Araújo, MS; Juliano, L; Lapa, AJ; Souccar, C; Moura-da-Silva, AM. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem. Pharmacol.* 11: 2151–2157. 2004.
- Magalhães, GS *et al.* Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie.* 87(8), 687–699. 2005.
- Seni-Silva, AC; Maleski, ALA; Souza, MM; Falcao, MAP; Disner, GR; Lopes-Ferreira, M; Lima, C. Natterin-like depletion by CRISPR/Cas9 impairs zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. *BMC Genomics.* 23(1): 123. 2022.