XXX Encontro Anual de Iniciação Científica
VII Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior
eaic 2021

ESTUDO DOS EFEITOS DE FOSFOLIPASES-D DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES* EM CULTURAS DE QUERATINÓCITOS

Bruno Abel Resende Silva (PIBIC/UEPG), Caroline Amanda da Silva, José Rosa Gomes (Orientador),
e-mail:onurbel14ars@gmail.com

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

Morfologia. Citologia e Biologia Celular.

Palavras-Chave: Queratinócitos, Loxosceles, Fosfolipase-D.

Resumo

Dentre as toxinas mais bem estudadas das aranhas do gênero *Loxosceles* destacam-se as Fosfolipases-D, onde os comprometimentos com a derme são bastante descritos na literatura, no entanto, estudos sobre a epiderme, são escassos, especialmente sobre os queratinócitos. Neste trabalho foram realizados ensaios com queratinócitos humanos, normais, adultos da linhagem HaCaT. Essas células foram incubadas com fosfolipases-D recombinantes de aranhas do gênero *Loxosceles* por diferentes tempos de tratamento e em diferentes concentrações e avaliadas quanto a morfologia e viabilidade. Os resultados obtidos mostraram aumento da viabilidade nos maiores tempos e concentrações testadas.

Introdução

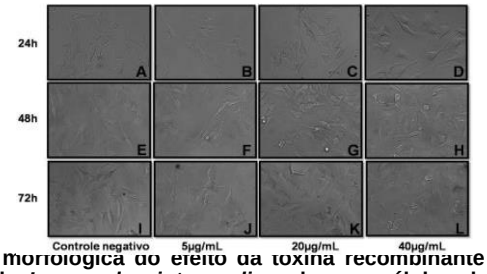
As aranhas marrons (*Loxosceles*) são bastante conhecidas por desencadearem nas suas vítimas uma necrose no local da pele picada (GREMSKI *et al*., 2021). Muitos são os trabalhos que estudam o envolvimento das toxinas presentes no veneno na derme, no entanto, são escassos os estudos sobre os queratinócitos da epiderme. Os queratinócitos possuem um papel fundamental na resolução de lesões, não só pela capacidade deproliferar e migrar, o que promove reparo do local, como também, por produzirem vários mediadores (STEINHOF *et al*., 2001). Diante do exposto, para este projeto foram avaliados os efeitos das fosfolipases-D recombinantes de *Loxosceles intermedia* sobre a morfologia, viabilidade e proliferação celular.

Material e Métodos

Células da Linhagem HaCaT, foram plaqueadas na densidade de cinco mil células por poço, tratados por 24, 48 e 72h com a fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT1) nas concentrações de 5, 20 e 40µg/mL (ensaios realizados em pentaplicata). Para o controle negativo as células permaneceram em meio de cultura sem soro fetal bovino. Em cada tempo e concentração do tratamento as células foram fotografadas para observação dos aspectos morfológicos. Para verificar a viabilidade e proliferação celular foi usado o método do MTT 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico. Após os tratamentos as células foram submetidas a exposição com MTT e os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO. A absorbância foi obtida em 550nm.

Resultados e Discussão

Os ensaios de morfologia mostraram um padrão celular semelhante entre as células tratadas com a fosfolipase-D de *Loxosceles intermedia* e os controles para todos os tempos testados (figura 1). De modo geral, as células mantiveram a morfologia tipicamente alongadas, sendo observadas algumas células de forma arredondada no tempo de 72 horas de tratamento em todos os grupos testados e também para o controle negativo.



Análise morfológica do efeito da toxina recombinante LiRecDT1 obtida de *Loxosceles intermedia* sobre as células da linhagem HaCaT. (A, B, C e D) Células tratadas por 24 horas, **(E, F, G e H)** células tratadas por 48 horas e **(I, J, K e L)** células tratadas por 72 horas. **(A, E e I)** representam o controle negativo (meio de cultivo desprovido de soro fetal bovino), **(B, F e J)** representam células tratadas com 5µg/mL **(C, G e K)** células tratadas com 20µg/mL e **(D, H e L)** células tratadas com 40µg/mL.

É possível observar que as células tratadas com 40µg/mL tiveram aumento da viabilidade e proliferação celular após 48 e 72h quando comparados aos controles e as demais concentrações de tratamento testadas (Figura 2).

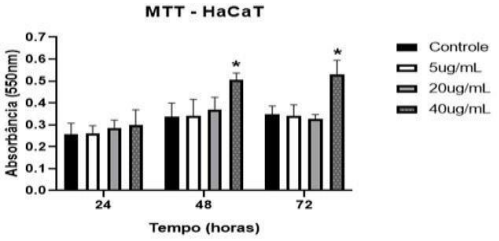


Figura 2: Viabilidade das células da linhagem HaCaT tratadas por diferentes tempos e com diferentes concentrações da toxina recombinante LiRecDT1 obtida de *Loxosceles intermedia* quantificada pelo método do MTT. As células foram tratadas nas concentrações de 5, 20 e 40µg/mL por 24, 48 e 72 horas. Como controle negativo foi usado meio de cultura sem soro fetal bovino. Resultados obtidos de experimentos realizados em pentaplicata.

Conclusão ou Conclusões

As células HaCaT não tiveram alterações morfológicas dependentes das concentrações testadas e apresentaram aumento da viabilidade e proliferação de acordo com o método de avaliação utilizado (MTT).

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento da Bolsa, a Fundação Araucária pelo financiamento do projeto, ao programa PIBIC/UEPG por proporcionar a realização do trabalho, aosprofessores José Rosa Gomes e a professora Ana Carolina Martins Wille por toda dedicação e atenção para ensinar e ao LME-UFPR e as pós graduandas Antonielle B. e Hanna Câmara da Justa.

1. GREMSKI, L. H. ; JUSTA, H. C. ; SCHEMCZSSEN, Z. ; BALDISSERA, A. B. ; SCHLUGA, P. ; OLIVEIRA, I. ; BÓIA-FERREIRA, M. ; MARTINS WILLE, ANA CAROLINA ; SENFF-RIBEIRO, ANDREA ; MATSUBARA, F. H. ; VEIGA, S.S. . Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins?. JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES, v. 27, p. 1-15, 2021. STEINHOFF, M.; BRZOSKA, T.; LUGER, T.A. Keratinocytes in epidermal immune responses. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., v. 1, p. 469–476, 2001.
2. STEINHOFF, M.; BRZOSKA, T.; LUGER, T.A. Keratinocytes in epidermal immune responses. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., v. 1, p. 469–476, 2001.

Figura 1:

ISSN 1676-0093