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

AVALIAÇÃO DE FOSFOLIPASES-D NO VENENO DE ARANHAS MARROM SOBRE DINÂMICAS CELULARES DE QUERATINÓCITOS HUMANOS

Caroline Amanda da Silva (PROVIC/UEPG), Bruno Abel Resende Silva (Co Autor), Ana Carolina Martins Wille (Orientador), e-mail: anacarolina.wille@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEBIOGEM

Ciências Biológicas (2.00.00.00-6), Morfologia (2.06.00.00-3), Citologia e Biologia Celular (2.06.01.00-0)

Palavras-Chave: *Queratinócitos, Loxosceles, Fosfolipases-D*

Resumo

O envenenamento por aranhas marrom freqüentemente causa em humanos a necrose da pele na região da picada. Entre as diversas toxinas que estão presentes nos venenos destas aranhas, destacam-se as fosfolipases-D que, quando isoladas, podem reproduzir os efeitos do envenenamento. Estudos relacionando os efeitos destas toxinas nos queratinócitos da epiderme são escassos, desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos de uma fosfolipase-D recombinante de aranha marrom sobre a dinâmica da migração em queratinócitos humanos. Os resultados sugerem que esta enzima possa estimular a migração destas células.

Introdução

O envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* pode provocar o loxoscelismo que pode evoluir para quadros clínicos distintos; cutâneo ou dermonecrótico ou cutâneo-visceral ou sistêmico (da SILVA *et al*., 2021). O desenvolvimento dos quadros clínicos deve-se as propriedades das toxinas encontradas no veneno, entre as quais se destacam as fosfolipases-D (GREMSKI *et al*., 2021). Estudos dos efeitos destas toxinas isoladas na pele mostraram amplo comprometimento da derme, porém existem poucos estudos sobre a epiderme, diante disso, neste projeto, foram analisados os efeitos das fosfolipases-D loxoscélicas sobre a migração de queratinócitos, as células mais abundantes da epiderme.

Material e Métodos

Foram plaqueadas 5x10^4 células da linhagem HaCaT de queratinócitos humanos em placas de 96 poços. Após 24 horas em cultura, as células foram mantidas por mais 2 horas com mitomicina C e um risco foi feito na monocamada de células com ponteira de micropipeta (Scratch). As células foram tratadas com 1 e 40µg/mL de uma fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT1) e os controles receberam apenas meio de cultura. As imagens das áreas livres de células foram avaliadas nos tempos de 0, 8 e 24 horas e a área calculada pelo software imageJ. Os experimentos foram realizados em pentaplicata. A análise estatística foi realizada pela análise de variância ANOVA.

Resultados e Discussão

Como mostrado na figura 1, é possível observar que após 24 horas as células HaCaT migraram e preencheram toda a área livre de células em todas as concentrações testadas.

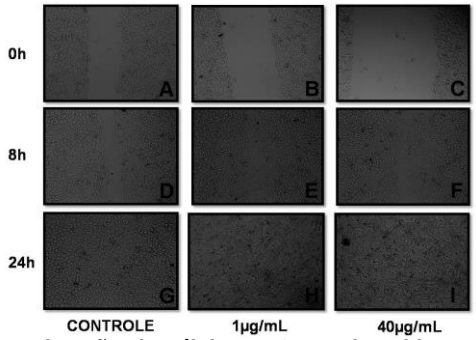


Figura 1. Migração de células HaCaT submetidas ao tratamento com fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia*. As células foram submetidas ao tratamento nas concentrações de 1 e 40µg/mL da fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles intermedia* por 0, 8 e 24horas e avaliadas pela técnica de Scratch

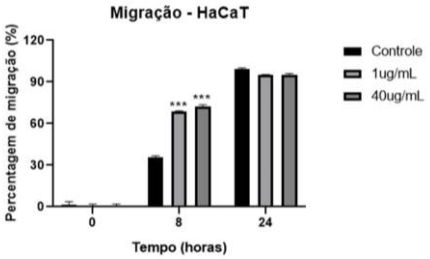


Figura 2. Percentagem de migração de células HaCaT submetidas ao tratamento com fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia*. As células foram submetidas ao tratamento nas concentrações de 1, 40 e 80 µg/mL da fosfolipase-D recombinante de *Loxosceles intermedia* por 0, 8 e 24horas pela técnica de scratch.

No tempo de 8 horas de tratamento foi possível observar uma diferença significativa entre o controle e os tratamentos (Figuras 1D,1E, 1F e 2), sugerindo que a fosfolipase-D de *Loxosceles intermedia* estimule a migração dos queratinócitos.

Conclusão ou Conclusões

Pela técnica utilizada é possível sugerir que a fosfolipase-D de *Loxosceles intermedia* esteja estimulando a migração dos queratinócitos e exerça um papel importante nos eventos fisiológicos desta célula.

Agradecimentos

Ao programa PIBIC/UEPG por proporcionar a realização do trabalho, a Fundação Araucária pelo financiamento e a professora Ana C. M. Wille e pós graduandas da UFPR Antonielle B. e Hanna C. J. pelas orientações.

1. GREMSKI, L. H. ; *et al.,* 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. Da SILVA *et al*., Brown Spiders' Phospholipases-D with Potential Therapeutic Applications: Functional Assessment of Mutant Isoforms Biomedicines, 2021.