

POTENCIAL VIRUCIDA DE MELITINA E APAMINA

IVE FRANCESCA TROCCOLI HEPPEL¹; JÉSSICA SEVILHA BARBOSA¹;
CRISTINA MENDES PETER²; TONY PICOLI³; GEFERSON FISCHER⁴

¹Acadêmica de Medicina Veterinária, UFPel – ivehepper@yahoo.com.br;
jessicasevilha@hotmail.com

² Residente em Saúde Coletiva - UFPel - cristina_peter@hotmail.com

³ Doutorando do PPGV-UFPel - picolivet@gmail.com

⁴Professor do Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel - geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A busca por produtos naturais com atividades biológicas e farmacológicas têm impulsionado a indústria e a pesquisa ao redor do mundo. Os peptídeos com ação antimicrobiana estão entre os mais pesquisados, pois representam uma alternativa ao uso de antimicrobianos sintéticos que trazem danos à saúde pública, além de dificuldades em diversos tratamentos pela resistência microbiana aos fármacos (HARVEY, 1999).

A melitina é um peptídeo, composto por 26 aminoácidos, presente no veneno de abelhas melíferas, correspondendo à aproximadamente 50% do peso seco do veneno (HABBERMAN, 1972), e é conhecida pela sua rápida ação citolítica que desestabiliza membranas celulares liberando seu conteúdo citoplasmático (DEMPSEY, 1990). Já a apamina, outro peptídeo bioativo que corresponde à aproximadamente 2% do peso seco do veneno, é a menor neurotoxina conhecida, com apenas 18 aminoácidos (CARDOSO et al., 2003).

Esses peptídeos têm conhecidas ações farmacológicas já descritas, mas, no entanto, atividades antivirais ainda são um desafio a se superar. A busca por fármacos antivirais tem impulsionado a pesquisa devido ao baixo êxito que as novas descobertas vêm apresentando: utilidade terapêutica limitada devido a altos graus e toxicidade (FAULKNER, 2002).

Na medicina veterinária, duas enfermidades virais destacam-se pela sua importância nas manifestações reprodutivas e queda da produtividade de rebanhos bovinos, prejuízos econômicos aos produtores e pelo alto potencial de disseminação dentro de rebanhos, a rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), causada pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e a diarreia viral bovina (BVD) causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). O primeiro vírus, da família Herpesviridae fica em latência no animal que, uma vez infectado, torna-se portador e disseminador pelo resto da vida. Já o segundo, um Flavivírus, pode passar despercebido no rebanho pela presença de animais persistentemente infectados que, embora sem infecção aparente, disseminam o vírus pelo rebanho (FLORES, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade virucida de melitina e apamina frente ao BoHV-1 e BVDV.

2. METODOLOGIA

Melitina e apamina foram adquiridas comercialmente e dissolvidas utilizando Meio Essencial Mínimo estéril (E-MEM), suplementado com antimicrobianos (penicilina, estreptomicina, enrofloxacina e anfotericina B), como diluente e estocadas na concentração de 1 mg/mL a -70°C.

A linhagem celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) foi selecionada neste experimento por ser permissível aos vírus estudados. Para cultivo das células, foi utilizado E-MEM suplementado com 10% com soro fetal bovino (SFB). Os experimentos foram realizados frente aos BoHV-1, cepa Los Angeles, e BVDV, cepa NADL. Células e vírus foram obtidos do Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas.

Para o ensaio da atividade virucida, os vírus foram colocados em contato com melitina (25 µg/mL), apamina (100 µg/mL) e sua associação (Melitina 25 µg/mL + Apamina 100 ng/mL) por até 24 horas, sob temperatura de 37°C. As concentrações selecionadas foram baseadas em testes de citotoxicidade realizados anteriormente pelo nosso grupo. Para controle foi utilizada suspensão vírica incubada em tampão fosfato-salina estéril pH 7,2 (PBS). Durante a incubação, em seis momentos foram coletadas alíquotas das suspensões víricas para realização das titulações virais: zero, uma, duas, quatro, oito e 24 horas de incubação.

Os diferentes tratamentos foram titulados realizando 8 diluições seriadas na base 10. Em sextuplicata, as diferentes diluições foram colocadas em placas de 96 cavidades, juntamente com células MDBK. Após 72 horas de incubação, a leitura foi realizada através da observação de efeito citopático em microscópio invertido e o título determinado como dose infectante em 50% de tecido celular (DICC₅₀/25µL) pelo método de Reed–Muench (1938).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Melitina apresentou grande poder virucida frente ao BoHV-1, inibindo totalmente as partículas virais em apenas 1 hora de contato, enquanto o controle apresentou pouca modificação do título viral durante as 24 horas do experimento. No entanto, frente ao BVDV, não apresentou efeito marcante e, os títulos do tratamento acompanharam os títulos do controle em todos os momentos avaliados (Figura 1A). O tratamento apenas com apamina não demonstrou efeito virucida na dose testada frente a nenhum dos vírus avaliados. Os tratamentos para os dois vírus acompanharam seus respectivos controles (Figura 1B).

Estudos mostram o potencial antiviral de melitina, porém sua alta citotoxicidade, em alguns casos, pode exigir sua associação à veículos que diminuam sua agressividade para as células. Melitina, em doses não tóxicas para linfócitos T e fibroblastos, foram capazes de inibir a infectividade dessas células pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), além de suprimir a expressão de diversos genes essenciais à replicação deste vírus (WACHINGER et al., 1998). HOOD el al. (2013) encontraram baixos efeitos tóxicos em células vaginais e grande efeito antiviral sobre HIV utilizando nanopartículas carregadas de melitina e sugerem a destruição do envelope do vírus como mecanismo de ação. FALCO el al. (2013) obteve êxito ao inibir, por inativação viral 95,3% a infectividade do Rhabdovírus causador da septicemia hemorrágica viral dos peixes utilizando imunolipossomas carregados de melitina.

O efeito virucida da associação entre as duas substâncias foi testado nas proporções contidas no veneno de abelhas *Apis mellifera*: em torno de 50% do peso seco corresponde a melitina e ao redor de 2% corresponde apamina (CERNE et al., 2010). Os resultados estão ilustrados na Figura 2 e demonstram uma ação potencializadora contra os dois vírus avaliados. Embora o efeito virucida sobre BoHV-1 siga os mesmos padrões e resultados da melitina agindo individualmente, o efeito contra BVDV foi amplificado.

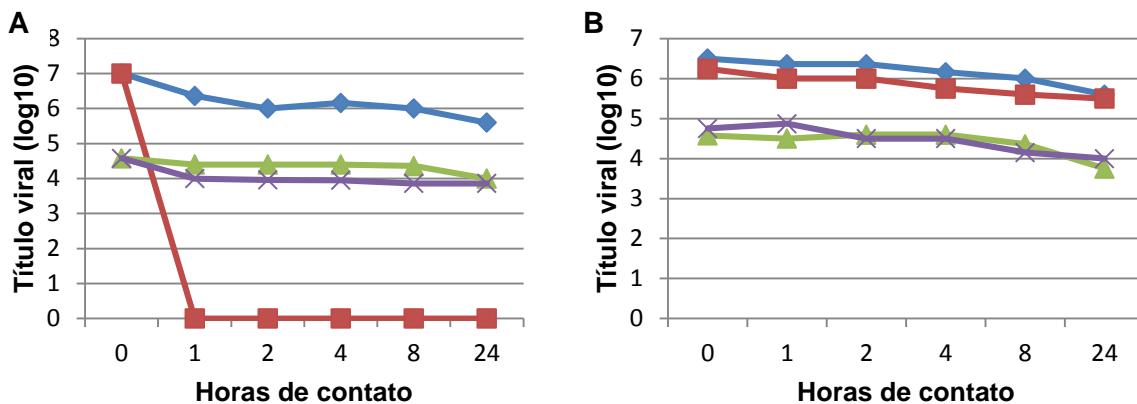


Figura 1. A) atividade virucida de melitina (25µg/mL) e B) atividade virucida de apamina (100 µg/mL), em temperatura de 37°C. (◆) controle de BoHV-1 (PBS); (▲) controle de BVDV (PBS); (■) tratamento sobre BoHV-1; (×) tratamento sobre BVDV.

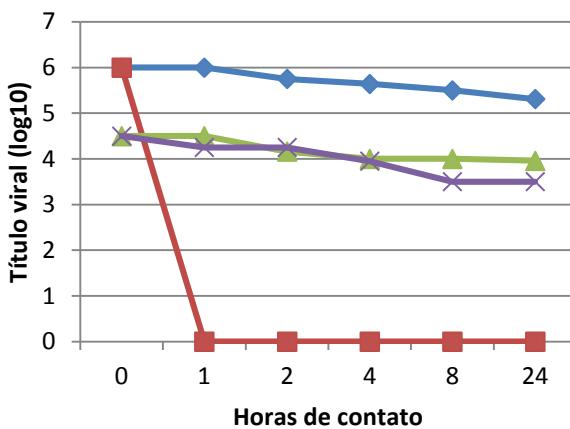


Figura 2. Atividade virucida da associação entre melitina (25µg/mL) e apamina (100 ng/mL) em temperatura de 37°C. (◆) controle de BoHV-1 (PBS); (▲) controle de BVDV (PBS); (■) tratamento sobre BoHV-1; (×) tratamento sobre BVDV.

Com melitina ou apamina atuando isoladamente sobre BVDV, ao final das 24 horas de contato com o vírus, os títulos não diferiram dos controles, incubados apenas com PBS e, o título caiu apenas 0.5 log₁₀ em relação ao momento zero horas, demonstrando ineeficácia. Com a ação sinérgica dos compostos, a diferença do início do experimento (zero horas de incubação) com o seu final (24 horas) foi de 1 log₁₀, caindo de 4.5 para 3.5 DICC₅₀/25µL, indicando 90% de inibição das partículas víricas de BVDV. O controle apresentou 68,4% de inibição viral e, essa diferença, correspondente a 0.5 log₁₀, indica uma eficácia na ação sinérgica, instigando novas pesquisas com distintas doses associadas de melitina e apamina para verificação de uma eficácia ainda maior e possíveis ações dose e tempo dependente dos compostos estudados sobre os vírus em questão e outros vírus de interesse médico veterinário.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a melitina tem grande poder virucida sobre BoHV-1, mas não apresentou o mesmo efeito em relação ao BVDV. A apamina, atuando individualmente, não é capaz, na dose testada, de atuar frente aos vírus avaliados. A associação entre as substâncias causou um incremento em suas ações virúcidas, principalmente na ação contra o BVDV.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALQUE, C.M S.; HADDAD, J.V. **Animais Peçonhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** São Paulo: Ed. Sarvier/Fapesp, 2003. p. 550.
- CERNE, K.; KRISTAN, K.C.; BUDIHNA, M.V.; STANOVNIK, L. Mechanisms of changes in coronary arterial tone induced by bee venom toxins. **Toxicon.**, v.56, n.3, p. 305-312, 2010.
- DEMPSEY, C.E. The actions of melittin on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1031, 143, 161, 1990.
- FALCO, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M.P.; COLL, J.; MICOL, V.; ESTEPA, A. Melittin-loaded immunoliposomes against viral surface proteins, a new approach to antiviral therapy. **Antiviral Research**, v. 97, n.2, p.218-221, 2013.
- FAULKNER, D.J. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 1-49, 2002
- FLORES, E. **Virologia Veterinária.** Santa Maria: Ed. da UFSM, 2012. p. 1008.
- HABERMAN, E. Bee wasp venoms. **Science**, 177, 314-322, 1972.
- HARVEY, A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 196-198, 1999.
- HOOD, J.L.; JALLOUK, A.P.; CAMPBELL, N.; RATNER, L.; WICKLINE, S.A. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. **Antivir Therapy**, v. 18, n.1, p. 95-103, 2013.
- WACHINGER, M.; KLEINSCHMIDT, A.; WINDER, D.; VON PECHMANN, N.; LUDVIGSEN, A.; NEUMANN, M.; HOLLE, R.; SALMONS, B.; ERFLE, V.; BRACK-WERNER, R. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. **Journal of General Virology**, v.79 (Pt 4), p. 731-740, 1998.