

CITOTOXICIDADE DA APAMINA SOBRE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774

ALESSANDRA GOULART TEIXEIRA¹; TONY PICOLI²; GEFERSON FISCHER³

¹Aluna de Graduação em Veterinária, UFPel – alegt5@hotmail.com

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel - picolivet@gmail.com

³Professor do Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel - geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O veneno de abelha é secretado por uma glândula especializada existente nas abelhas operárias e armazenado em uma vesícula até o momento de sua aplicação, mediante ferroada (BENTON et al., 1963). É uma mistura complexa de compostos nitrogenados, que correspondem a mais de 90% de seu peso seco, contendo componentes biologicamente ativos como enzimas, peptídeos e aminas biogênicas que conferem propriedades farmacológicas, como ações anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. (GLÄTTLI ET AL., 2006; DE ABREU et al., 2010).

A apamina é um peptídeo bioativo presente na composição do veneno de abelha, que corresponde a cerca de 2% do peso seco. É a menor neurotoxina conhecida, com apenas 18 aminoácidos, de fórmula molecular $C_{79}H_{131}N_3O_{24}S_4$ e peso molecular 2027.34. Conforme estudos, a apamina tem ação nas membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico, bloqueando a transmissão de determinados impulsos inibitórios (CRUZ-LANDIM et al., 2002; CARDOSO et al., 2003).

A inesgotável fonte de produtos naturais tem despertado o interesse da indústria farmacêutica nas últimas décadas e, diversos estudos têm revelado vários grupos de compostos químicos com funções biologicamente ativas com potencial para novas formulações comerciais (HARVEY, 1999).

O cultivo de linhagens de células *in vitro* permite a manutenção de células vivas independente do organismo que a originou. Esse método é de grande importância, pois é um modelo biológico mais simples e tende a oferecer respostas mais simplificadas quando comparados a experimentos com animais. Além disso, é um método que pode substituir o uso de animais como cobaias nos experimentos científicos, visando assim o bem-estar animal (MIGITA, 2012). Com base nos efeitos já descritos e hipóteses levantadas pelo nosso grupo, objetivamos examinar os efeitos da apamina sobre macrófagos da linhagem celular J774 através de análises distintas.

2. METODOLOGIA

Apamina (Sigma-AldrichCorp., St. Louis, MO) foi dissolvida utilizando Meio Essencial Mínimo estéril (E-MEM) como diluente e estocada na concentração de 1 mg/mL a -70°C. Quando da realização dos testes, essa solução de estoque foi diluída em E-MEM em concentrações que variaram de 10 a 100 µg/mL para ensaios com MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) e de 1,25 a 10 µg/mL para citometria de fluxo. Macrófagos J774 mantidos em botijões com nitrogênio líquido foram descongelados e mantidos em E-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) até o momento do uso. As células foram transferidas para placas de 96 cavidades (100 µL/cavidade, aproximadamente 3×10^4 células/cavidade) e mantidas em estufa úmida sob temperatura de 37°C com 5% de

CO₂. Após, o meio foi cuidadosamente aspirado e foram adicionados 100 µL/cavidade das diferentes concentrações de apamina testadas, com posterior incubação por 72 horas para leitura. Como controles foram utilizadas células mantidas em E-MEM, sem nenhum tipo de tratamento. Os ensaios foram realizados em sextuplicata.

A leitura se deu através da realização do ensaio com MTT, para determinação da viabilidade celular, conforme Mosmann (1983). Após 15 minutos de agitação constante, as placas foram submetidas à espectrofotometria e as absorbâncias foram calculadas sob comprimento de onda de 492 nm.

Quanto à citometria de fluxo, após as 72 horas de exposição à apamina em diferentes concentrações, a análise de apoptose e necrose celular foi realizada adicionando 2 µL do fluoróforo Annexin V conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) por uma hora e iodeto de propídeo (IP) por 10 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da avaliação pela redução do MTT, não foi possível estabelecer uma concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) dos cultivos celulares, já que na maior concentração testada (100µg/mL) houve apenas 12,03% ± 3,1% de morte celular, conforme demonstra a Figura 1a. Zhou et al. (2013) também não encontraram CC₅₀ para apamina sobre células hepáticas humanas e, na maior concentração testada (800µg/mL) encontraram 33,85% ± 1,27% de morte celular. Esta análise determina a atividade mitocondrial das células (MOSMANN, 1983) e, embora tenha sido observada alta atividade das mitocôndrias, outros parâmetros de avaliação da saúde celular podem estar comprometidos, já que as células podem aumentar a atividade mitocondrial a fim de prover energia para mecanismos de defesa celular (ZHOU et al., 2013).

A Figura 1b revela que, pelas análises em citometria de fluxo, houve taxas de apoptose e necrose em células tratadas com apamina, parâmetros esses não revelados pelo teste com MTT. O controle de células, por sua vez, apresentou em sua grande maioria células normais (77,7% ± 6,2%). As células que sofreram exposição à apamina apresentaram taxas maiores de apoptose e necrose. Zhou et al. (2013), ao realizar análises com células que não foram sensíveis à apamina pelo teste MTT, encontraram 4,6% de células em necrose e 2,8% de células em processo de apoptose quando expostas por 24 horas à 100µg/mL de apamina.

As taxas de apoptose foram obtidas através da fluorescência emitida pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado ao Anexin V que reconhece a fosfatidilserina em células apoptóticas. Já as taxas de necrose foram obtidas através da fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo (IP), que se intercala ao DNA de células com membranas comprometidas, já que o peso molecular do IP não permite sua internalização em células com membranas intactas. Pôde-se, portanto, distinguir diferentes populações de células: células normais com baixos níveis de fluorescência (FITC-, IP-), células em apoptose (FITC+, IP-) e células em necrose (FITC-, IP+ ou FITC+, IP+).

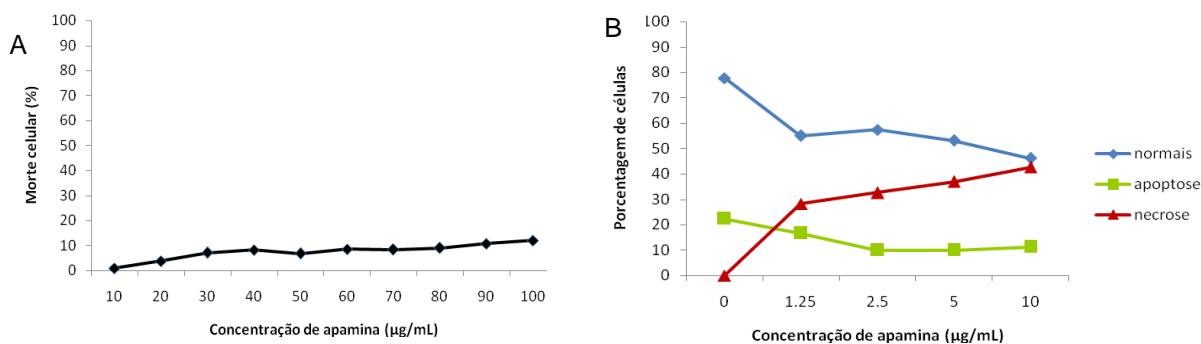


Figura 1. Citotoxicidade da apamina sobre células da linhagem J774. A - Avaliação pela redução do MTT. B - Avaliação de apoptose/necrose por citometria de fluxo.

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (SARASTE & PULKKI, 2000; GRIVICICH et al., 2007). Segundo Hengartner (2000), existem diferentes fatores que podem desencadear a apoptose, como a ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos ao DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis elevados de espécies reativas ao oxigênio. A apoptose pode ser iniciada por uma via extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial). A primeira é desencadeada após a ligação de ligantes específicos à receptores, do tipo fator de necrose tumoral, o que desencadeia a cascata das caspases e todos os processos apoptóticos conhecidos. A segunda via, diz respeito à mitocôndria como precursora dos sinais para apoptose após estresse intra ou extracelular. Essa organela aumenta sua atividade ao integrar estímulos de morte celular induzindo sua permeabilização, com consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (HENGARTNER, 2000; DESAGHER & MARTINOU, 2000; GRIVICICH et al., 2007).

Torna-se importante a determinação da toxicidade de substâncias através de variadas análises, a fim de avaliar diferentes parâmetros de viabilidade celular. O teste de redução do MTT é amplamente utilizado como ferramenta de determinação da citotoxicidade de um composto a ser testado. Ao determinar a taxa de morte celular por esta avaliação, os resultados parecem ser confiáveis, uma vez que não há presença de atividade mitocondrial. Porém, ao analisar viabilidade celular, a redução do MTT pelas enzimas desidrogenas mitocondriais, não indicam completa saúde da célula, como demonstrado por nossos resultados.

4. CONCLUSÕES

Apamina, nas concentrações testadas, não apresenta toxicidade em macrófagos J774 ao teste de redução do MTT, porém, é capaz de induzir processos de apoptose e necrose nessa linhagem celular quando avaliada por citometria de fluxo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENTON, A.W.; MORSE, R.A.; STEWART, J.D. Venom collection from honey bess. **Science**, v.142, p.228-230, 1963.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALQUE, C.M S.; HADDAD, J.V. **Animais Peconhentos No Brasil Biologia Clinica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp.(2003).
- CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto, FUNPEC-Editora.(2002).
- DE ABREU, R.M.; SILVA DE MORAES, R.L.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Biochemical and cytochemical studies of de enzymatic activity the venom glands of workers of honey bee Apis mellifera L.(Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v.41, p.172-175, 2010.
- DESAGHER, S.; MARTINOU J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v.10, p. 369-376, 2000.
- GLÄTTLI, A.; CHANDRASEKHAR, I.; VAN GUNSTEREN, W.F. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. **European Biophysics Journal**, v.35, p.255-267, 2006.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- HARVEY, A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drugs discovery? **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 20, n.5, p. 196-198, 1999.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.
- MIGITA, N.A. **Cultivo celular *in vitro*: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. 2012. Monografia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55- 63, 1983.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res.**, v. 45, p. 528-537, 2000.
- ZHOU, J. ; QI, Y.; DIAO, Q.; WU, L.; DU, X.; LI, Y.; SUN, L. Citotoxicity of melittin and apamin in human hepatic L02 and HepG2 cells in vitro. **Toxin Reviews**, v. 32, n. 4, p.60-67, 2013.