

EFEITOS SUPRESSORES DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS CAUSADOS PELA MELITINA ISOLADA DE VENENO DE ABELHAS

ALESSANDRA GOULART TEIXEIRA¹; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER²;
GEFERSON FISCHER²; TONY PICOLI³

¹Universidade Federal de Pelotas – alegt5@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - silviaohubner@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - picolivet@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O macrófago é uma importante célula do sistema imune que participa da resposta inata, através da fagocitose de micro-organismos e partículas estranhas ao hospedeiro, e condiciona a adaptativa pela sua função de apresentação de antígenos (NEVES, 2015). Após a fagocitose, uma via efetora comum de defesa é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o óxido nítrico (NO), que funciona como agente microbicida produzido por macrófagos ativados (PADRÃO, 2009). Algumas dessas funções podem ser avaliadas *in vitro*, e podem auxiliar na pesquisa e/ou desenvolvimento de produtos que participam na modulação das funções dos macrófagos.

Tendo em vista a crescente busca da comunidade científica por alternativas terapêuticas que utilizem fontes naturais, o veneno da abelha tem se mostrado como uma alternativa em pesquisas, com importantes funções biológicas já descritas (GLÄTTLI et al., 2006). A melitina é o principal peptídeo bioativo presente no veneno da abelha e compreende 50% do peso seco do veneno (HABERMANN, 1972). Estudos *in vitro* já demonstraram citotoxicidade desse peptídeo frente a diversas linhagens celulares e micro-organismos e o estabelecimento de concentrações seguras ao uso (PICOLI et al., 2016; PICOLI et al., 2018).

Em estudos prévios, FONSECA et al. (2017) descrevem a capacidade imunossupressora da melitina sobre a produção de anticorpos e, visando identificar possíveis alterações nas funções de células do sistema imune inato, o presente estudo objetivou avaliar a capacidade fagocítica e a produção de óxido nítrico em macrófagos expostos à melitina.

2. METODOLOGIA

Em todas as etapas, as células foram cultivadas em Meio essencial mínimo com sais de Eagle (E-MEM) acrescido de penicilina, estreptomicina, enrofloxacin e anfotericina B. A citotoxicidade foi avaliada pelo método descrito por Mosmann et al. (1983), através do ensaio de redução do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). As concentrações de melitina (Sigma-Aldrich) avaliadas variaram de 0,25 a 10 µg/ml e os testes realizados em triplicata.

Células RAW 264.7 foram cedidas pela EMBRAPA - Suínos e Aves (Concórdia/SC) e foram cultivados em garrafas de cultivo celular com E-MEM acrescido de 10% SFB. Para os experimentos, foram semeadas em placas de cultivo celular (2x10⁵ células/poço) e, após duas horas e as células aderidas, os testes foram prosseguidos. Para coleta de macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos suíços machos com idade entre 15 e 16 semanas. Após a eutanásia, que seguiu os preceitos de ética e bem-estar animal, foi realizado lavado peritoneal

com a infusão de 10 ml de solução tampão salina fosfato estéril (PBS, pH 7,2) gelada. A suspensão foi centrifugada e o pellet de células ressuspensão em E-MEM com 5% SFB. As células viáveis foram contabilizadas pelo método da exclusão pelo azul de tripan e 10^5 células por poço foram semeadas em placas de 96 cavidades (100 μ l) e, após 2 horas e as células aderidas, os testes foram prosseguidos.

Para análise de produção de NO, foram utilizados os macrófagos peritoneais previamente aderidos às placas. O sobrenadante foi removido e as células foram expostas ou não à melitina (1,25; 2,5 e 5 μ g/ml), na presença ou não de 100 ng.ml⁻¹ de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*). Células não expostas e expostas apenas ao LPS foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Após 48 horas de incubação, os sobrenadantes foram transferidos a outra placa e adicionados igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, as absorbâncias foram mensuradas sob comprimento de onda 550 nm. A concentração de nitritos foi calculada por curva padrão e expressos em μ mol.L⁻¹/10⁵ células. O ensaio foi realizado em 3 repetições.

Para ensaio de fagocitose, foram utilizadas as células RAW 264.7 previamente aderidas às placas. O sobrenadante foi removido e foi adicionada melitina (1, 2 e 3 μ g/ml). Após 24h, adicionou-se 10 μ L/poço da solução de fagocitose (0,3 mL da solução de vermelho neutro a 0,02 g/mL em DMSO e 0,02 g de zimosan não opsonizado em 3 mL de PBS) e incubou-se por 45 minutos. As células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de Baker por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a retirada adicionou-se 100 μ L/ poço de solução de extração (ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v). Após solubilização, as absorbâncias foram medidas a 550 nm. O ensaio foi repetido em triplicata.

Em todos os testes, foi realizada análise de variância (ANOVA) com comparação entre médias pelo teste Tukey, adotando confiança de 95%, com auxílio do software BioEstat® versão 5.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao teste de viabilidade celular, melitina desencadeou significativa queda da viabilidade a partir da concentração de 4 μ g/ml ($p < 0,05$), sendo as imediatamente anteriores seguras ao uso, sem interferência nos resultados (Figura 1A). PICOLI et al. (2016) relataram a citotoxicidade da melitina em diferentes linhagens celulares (MDBK, CRFK, MDCK, RK13 e Vero) e, corroborando com nossos resultados, as concentrações não tóxicas também ficaram abaixo de 3 μ g/ml de melitina.

A explosão respiratória e as espécies reativas ao oxigênio (ROS) produzidas pelos macrófagos constituem uma importante via nos mecanismos microbicidas apresentados por estas células. O NO é produzido pelos macrófagos após ativação da enzima iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) por citocinas (especialmente interferon gamma). O NO auxilia a combater uma grande variedade de patógenos e células estranhas ao organismo, como as tumorais (PADRÃO, 2009). No presente estudo nota-se, através da Figura 1B, o papel supressor da melitina sobre a produção de NO de macrófagos peritoneais. Ao passo que LPS (controle positivo) contribuiu para produção de 53,55 μ mol.L⁻¹/10⁵ células, a melitina causou diminuição dessa produção, mesmo em células que foram estimuladas com LPS. A concentração 5 μ g/ml, mesmo apresentando alguma toxicidade (38%), foi utilizada como comparativo às concentrações não tóxicas, e o resultado demonstrou a mesma absorbância entre os grupos ($p > 0,05$).

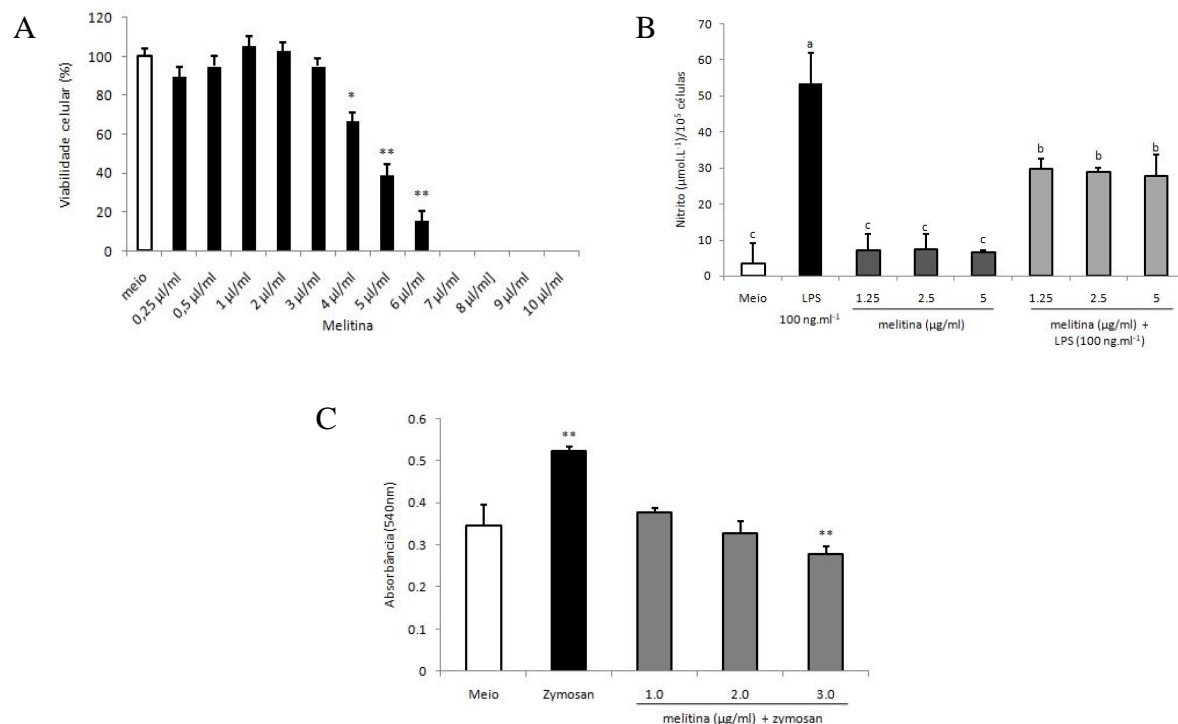


Figura 1. Efeitos biológicos da melitina sobre macrófagos. A) Viabilidade celular (%) de macrófagos peritoneais expostos à melitina e avaliados pela redução do MTT. B) Efeito da melitina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais. C) atividade fagocítica de células RAW 264.7 após exposição à melitina. Diferenças significativas do controle de células (meio) pelo teste Tukey são expressas * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo mesmo teste.

De modo semelhante, a atividade fagocítica dos macrófagos também sofreu decréscimo após a exposição destas células à melitina sob concentração 3 µg/ml (Figura 1C), ao passo que células não tratadas com melitina apresentaram maior poder fagocítico ($p < 0,05$). As funções dos macrófagos são tão fundamentais para a defesa do organismo que estas células possuem mecanismos alternativos que se completam e funcionam concomitantemente, como enzimas proteolíticas, acidificação do fagolisossoma, peptídeos catiônicos, proteínas que ligam ferro, e radicais de oxigênio e nitrogênio para destruir fagócitos (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

Além da supressão da atividade de macrófagos apresentada neste estudo, melitina já foi relatada como supressora da resposta imune humoral, ao diminuir a produção de imunoglobulinas G, como relatam FONSECA et al. (2017) em seus estudos. Esses autores imunizaram camundongos com vacina contra herpesvírus bovino tipo 1 acrescidas de diferentes dosagens de melitina e, conforme houve a elevação da concentração da melitina, houve também a diminuição da produção de anticorpos específicos.

Substâncias que demonstrem papel imunossupressor não devem ser tratadas como impróprias para utilização em métodos terapêuticos, já que existem quadros clínicos onde a correta e controlada imunossupressão é primordial para o combate da sintomatologia clínica, como é o caso das rejeições de órgãos por transplantados e das doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus. Nesse sentido, os estudos com a melitina devem continuar para aprimorar os resultados, elucidar

mecanismos de ação e objetivando a formulação de produtos que possam contribuir com a melhoria da qualidade de vida animal e humana.

4. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos, conclui-se que a melitina, em concentrações não tóxicas aos macrófagos utilizados, foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico e reduzir a capacidade fagocítica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FONSECA, R. N.; PICOLI, T.; TEIXEIRA, A. G.; PETER, C. M.; LOPES, M. G.; FISCHER, G. Resposta imune humoral de animais imunizados com vacina contendo melitina isolada do veneno de abelha. In: **XXV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFPEL**, Pelotas, **Anais...**, 2017.

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, n.3, p.255-267, 2006.

HABERMAN, E. Bee and Wasp Venoms. **Science**, v.177, p.314-322, 1972.

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.

NEVES, E. M. S. F. T. **Macrófago: Biologia, Diversidade e Função**. 2015. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa.

PADRÃO, J. C. **Identificação da via de degradação da Óxido Nítrico Sintase induzida em macrófagos ativados e infectados pelo Toxoplasma gondii**. 2009. 51f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

PICOLI, T.; PETER, C. M.; VARGAS, G. D.; HUBNER, S. O.; LIMA, M.; FISCHER, G. Potencial antiviral e virucida da melitina e apamina contra herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 595-604, 2018.

PICOLI, T.; PICH, C. S.; LOPES, M. G.; TEIXEIRA, A. G.; FISCHER, G. Sensibilidade de linhagens celulares à melitina isolada de veneno de abelha. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 101-116, 2016.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 825-852, 2002.