

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Prospecção de atividades biológicas da apamina e melitina

Tony Picoli

Pelotas, 2016

Tony Picoli

Prospecção de atividades biológicas da apamina e melitina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catálogo na Publicação

P598p Picoli, Tony

Prospecção de atividades biológicas da apamina e melitina / Tony Picoli ; Geferson Fischer, orientador. — Pelotas, 2016.

107 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Citotoxicidade. 2. Antimicrobiano. 3. Antibiofilme. 4. Virucida. 5. Peptídeo. I. Fischer, Geferson, orient. II. Título.

CDD : 636.08926

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Tony Picoli

Prospecção de atividades biológicas da apamina e melitina

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/11/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Profª. Dra. Silvia de Oliveira Hübner
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. João Luíz Zani
Doutor em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses pela Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho a todos aqueles que, pelos mais diversos motivos, não tiveram a oportunidade de trilhar uma jornada intelectual como esta, mas que apesar disso, nunca deixaram de acreditar em minha caminhada e sucesso ...

Agradecimentos

Aos espíritos de luz que acompanham minha jornada indicando-me sempre os melhores caminhos a trilhar.

À minha família por acreditar em meus passos, especialmente à minha mãe Rosangela por não medir esforços para auxiliar-me sempre que necessário para que, juntos, eu pudesse sempre alcançar meus objetivos. Ao meu bom irmão Ivan, companheiro de todas as horas e de aventuras mas que, além disso, torna-se a cada dia um exemplo de persistência, garra e superação.

À minha noiva Thaís pelo companheirismo, apoio e também pelas broncas quando me encontrava ocioso ao extremo. Sua presença, palavras e brincadeiras alegraram até mesmo os meus dias mais estressantes. A filhinha Benedicta que nunca deixou de estar presente e de nos amar em todos os momentos. Aos meus sogros Seu Neri e Dona Marisa, meu muito obrigado pela amizade, confiança e carinho de vocês.

Ao meu orientador, professor Geferson Fischer, por transpassar a barreira do relacionamento profissional, tornando-se grande amigo. Obrigado pela confiança e por auxiliar em meu crescimento profissional e pessoal. Ao professor e amigo Antonio Sérgio Varela Júnior, por não medir esforços para que grande parte deste trabalho fosse realizado.

À Universidade Federal de Pelotas por permitir a realização desta etapa intelectual de minha vida e por ser minha "casa" há 11 anos. À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Virologia e Imunologia e toda sua equipe, por me receber e permitir fazer parte deste grupo. À profa. Silvia, ao prof. Marcelo e prof. Gilberto, obrigado pelos ensinamentos e confiança. Aos demais amigos e companheiros de trabalho, Paulo, Débora, Fábio, Clarissa, Maureen, Fernanda, Zeca, Matheus, Dona Márcia e todos os alunos que fizeram parte dessa trajetória, meu muito obrigado pela companhia.

Ao Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional pela importância que tem em minha trajetória acadêmica e por abrir as portas mais uma vez para que eu pudesse trabalhar em suas instalações. Em especial agradeço ao amigo professor João Luiz Zani pela amizade, companheirismo e conselhos e à amiga Cristina Mendes Peter pelo apoio mútuo nesses anos todos de convivência.

Aos CLA Paulo Eduardo, Ivan, Victor e Sílvia, as mais desvairadas aventuras ainda estão por vir. Obrigado até aqui!

À todos os companheiros de trabalho do C.E.U. Nossa Senhora das Graças, meu muito obrigado pelo incentivo e apoio, e por auxiliar em meu crescimento moral.

Aos demais amigos e familiares pela compreensão nos meus momentos de ausência e pelo incentivo e confiança em mim depositados!

Obrigado a todos!

"O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos"

Lao Tsé

Resumo

PICOLI, Tony. **Prospecção de atividades biológicas da apamina e melitina.** 2016. 107f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A busca por novos fármacos têm levado as pesquisas ao encontro dos produtos naturais que oferecem uma quantidade inimaginável de princípios ativos ainda desconhecidos. A apicultura moderna é um segmento da agropecuária que fornece alguns produtos naturais como a própolis, o mel, a cera, a geleia real e a apitoxina, que vêm sendo alvo de pesquisas devido às diversas atividades biológicas já apresentadas. A apitoxina (veneno de abelhas) é uma complexa mistura de substâncias bioativas, entre elas os peptídeos apamina e melitina. O primeiro trata-se da menor neurotoxina conhecida e com apenas 18 aminoácidos em sua composição representa 2% do peso seco do veneno. Já melitina, composta de 26 aminoácidos, corresponde a 50% do peso seco do veneno e é um conhecido peptídeo tóxico capaz de causar lise em diversos tipos celulares. Neste sentido, este estudo objetivou caracterizar estes dois peptídeos quanto à sua citotoxicidade e seu poder antimicrobiano. Através do ensaio de redução do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) foi possível determinar as concentrações citotóxicas de melitina para 50% dos cultivos celulares (CC_{50}), que variou de 2,3 a 4,1 $\mu\text{g/mL}$ e a CC_{90} , que variou de 2,7 a 4,7 $\mu\text{g/mL}$ para diferentes linhagens celulares e, ao expor estas células frente à melitina por diferentes períodos pôde-se observar que com apenas 5 minutos de exposição, houve queda nas viabilidades celulares. Já os ensaios de toxicidade realizados em citometria de fluxo demonstram que, com concentrações de melitina abaixo das consideradas tóxicas pelo ensaio de redução do MTT, as células já apresentavam sinais de toxicidade da melitina, alterando os padrões de apoptose e necrose, aumentando a peroxidação das membranas lipídicas (LPO), assim como a produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e da fragmentação de seu DNA. Por microscopia confocal foi possível a observação de focos de apoptose e necrose e do aumento da fluidez das membranas das células proporcional ao aumento da concentração de melitina em que essas foram expostas. Houve correlação positiva entre LPO e ROS ($r=0,3158$, $p<0,05$), taxa de apoptose ($r= 0,4978$, $p<0,05$) e com a funcionalidade das mitocôndrias ($r= 0,3149$, $p<0,05$). LPO parece iniciar os demais eventos de toxicidade celular avaliados e aumentar a funcionalidade mitocondrial em resposta ao estresse sofrido pelas células. Sendo assim, a citometria de fluxo e a microscopia confocal demonstraram eficiência em auxiliar a desvendar os mecanismos de toxicidade de melitina e se portam como técnicas complementares ao ensaio MTT, que avalia a viabilidade celular apenas através da funcionalidade mitocondrial. Quanto à atividade antiviral da melitina, houve a inativação de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), especialmente na concentração 2 $\mu\text{g/mL}$. Apamina atuando

isoladamente não apresentou poder antiviral, porém quando aliada à melitina, apresentou efeito antiviral contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Resultados com padrões semelhantes ocorreram ao analisar o poder virucida das substâncias, quando melitina inativou BoHV-1 em 2 horas de incubação com este vírus mas não apresentou ação contra o BVDV, assim como a apamina, mas a associação potencializou o efeito virucida contra BVDV. Já quanto à atividade antibacteriana, a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de melitina foram, respectivamente (em µg/ml), frente a *Staphylococcus aureus* (6-7 e 32-64), *Escherichia coli* (40-42,5 e 64-128) e *Pseudomonas aeruginosa* (65-70 e 64-128). Biofilmes de *S. aureus* foram mais sensíveis à ação da melitina quanto comparados aos biofilmes produzidos pelas Gram negativas. Melitina foi capaz de destruir biofilmes pré-formados pelas três espécies bacterianas estudadas além de inibir a formação dos biofilmes por estas espécies quando foram previamente incubadas com melitina em concentrações abaixo da CIM. Os resultados são promissores quanto à capacidade antimicrobiana das substâncias apresentando potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou sanitizantes e, os mecanismos de toxicidade avaliados podem auxiliar nesse desenvolvimento.

Palavras-chave: citotoxicidade; antimicrobiano; antibiofilme; virucida; peptídeo

Abstract

PICOLI, Tony. **Prospecting of biological activities of apamin and melittin**. 2016. 107f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The search for new drugs leads the researchs to meeting the natural products that offers an unimaginable amount of still unknown active principles. The modern apiculture is a segment of agriculture that provides some natural products such as propolis, honey, wax, royal jelly and apitoxin, which have been the subject of research due to the various biological activities already presented. Apitoxin (bee venom) is a complex mixture of bioactive substances, and between them the peptides apamin and melittin. The first is the smaller known neurotoxin and, with only 18 amino acids in its composition, represent 2% of the dry weight of the venom. Melitin, composed of 26 amino acids, corresponds to 50% of the dry weight of the venom and is a known toxic peptide capable of causing lysis in several cell types. In this sense, this study aims to characterize these two peptides as to their cytotoxicity and their antimicrobial power. By the reduction of MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2-5-diphenyl-2H-tetrazolate bromide) test, it was possible to determine the cytotoxic concentrations of melittin to 50% of the cell cultures (CC50) which ranged from 2.3 to 4.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and CC90, ranging from 2.7 to 4.7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for different cell lines, and by expose these cells to melina for different periods it was observed that only 5 minutes of exposure, there was decrease in cellular viability. The toxicity tests performed in flow cytometry shows that, with melittin concentrations below the toxic concentration considered by the MTT reduction test, the cells showed signs of melittin toxicity, altering the patterns of apoptosis and necrosis, increasing the peroxidation of membranes (LPO), as well as an intracellular production of oxygen reactive species (ROS) and the fragmentation of their DNA. By confocal microscopy it was possible to observe foci of apoptosis, necrosis and the increase of cell membranes fluidity proportional to the increase in the concentration of melittin in which they were exposed. There was a positive correlation between LPO and ROS ($r = 0.3158$, $p < 0.05$), apoptosis rate ($r = 0.4978$, $p < 0.05$) and mitochondrial functionality ($r = 0.3149$, $P0.05$). LPO seems to initiate the other evaluated events of cellular toxicity and increase mitochondrial functionality in response to the stress undergone by the cells. Therefore, the flow cytometry and confocal microscopy have demonstrated efficiency in helping to unravel the mechanisms of melittin toxicity and behave as complementary techniques to the MTT assay, which evaluates the cellular viability by mitochondrial functionality. As for the antiviral activity of melittin, there was inactivation of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), especially at 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ concentration. Apamin acting alone did not present antiviral power, but when allied to melittin, presented antiviral effect against bovine viral diarrhea virus (BVDV). Results with similar patterns occurred when analyzing the virucidal power of the substances,

when melittin inactivated BoHV-1 with 2 hours of incubation with this virus but showed no action against BVDV, as well as apamine, but the association potentiated their virucidal effect against BVDV. As for antibacterial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of melittin were, respectively (in $\mu\text{g} / \text{mL}$), against *Staphylococcus aureus* (6-7 and 32-64), *Escherichia coli* (40- 42,5 and 64-128) and *Pseudomonas aeruginosa* (65-70 and 64-128). Biofilms of *S. aureus* were more sensitive to the action of melitin compared to biofilms produced by Gram negative bacteria. Melittin was able to destroy preformed biofilms by the three bacterial species studied and inhibited the formation of biofilms by these species when they were previously incubated with melittin at concentrations below MIC. The results are promising as to the antimicrobial capacity of the substances presenting potential for the development of new drugs and / or sanitizers and the mechanisms of toxicity can aid in the development.

Keywords: cytotoxicity; antimicrobial; antibiofilm; virucidal; peptide

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química da melitina e a sequência exata de seus 26 aminoácidos	17
Figura 2	Estrutura tetramérica de melitina (vista frontal e lateral)	17
Figura 3	Conformações do arranjo monomérico da melitina	18
Figura 4	Estrutura química da apamina e a sequência exata de seus 18 aminoácidos	18

Artigo 1

Figura 1	Viabilidade de linhagens celulares submetidas ao tratamento com as concentrações citotóxicas 50% e 90% (CC50 e CC90) de melitina em função do tempo de exposição	30
----------	--	----

Artigo 2

Figura 1	Apoptose e necrose de células MDBK expostas à melitina e analisadas por citometria de fluxo	50
Figura 2	Microfotografias de focos de apoptose e necrose obtidas a partir de microscopia confocal de células MDBK tratadas com melitina .	52
Figura 3	Microfotografias obtidas através de microscopia confocal demonstrando fluidez de membrana em células MDBK tratadas com melitina	54
Figura 4	Diagrama de correlações de análises realizadas com células MDBK tratadas com melitina	55

Artigo 3

Figura 1	Atividade antiviral da melitina após 72 horas	70
Figura 2	Atividade antiviral da associação entre melitina e apamina após 72 horas	71
Figura 3	Atividade virucida da melitina (25 µg/mL) após 24 horas de contato com herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina	72
Figura 4	Atividade virucida da associação entre melitina (25 µg/mL) e apamina (100 ng/mL) após 24 horas de contato com herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina	73

Artigo 4

Figura 1	Ação da melitina sobre biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em suas concentrações inibitórias mínimas (MIC), dez vezes menor (1/10 x MIC) e cem vezes menor (1/100 x MIC), após 1, 2 e 4 horas de exposição	82
Figura 2	Produção de biofilmes por bactérias previamente submetidas à três diferentes concentrações da melitina a partir da concentração inibitória mínima (MIC) durante 24 horas	84

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Concentrações citotóxicas 50% e 90% de melitina para linhagens celulares	28
----------	--	----

Artigo 2

Tabela 1	Taxa de morte celular de células MDBK tratadas com melitina e avaliada a partir da redução do MTT	49
Tabela 2	Taxas de peroxidação lipídica de membranas (LPO) quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), taxa de fragmentação de DNA (fragDNA) e potencial elétrico de membrana mitocondrial (MMP) de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) submetidas a tratamentos com melitina em distintas concentrações, obtidas por citometria de fluxo	53

Artigo 4

Tabela 1	Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória para 50% das células bacterianas (IC ₅₀) da melitina	81
----------	--	----

Sumário

1 Introdução	15
2 Hipótese	20
3 Objetivos	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 Artigos	22
4.1 Artigo 1	22
4.2 Artigo 2	39
4.3 Artigo 3	60
4.4 Artigo 4	74
5 Conclusão Geral	91
Referências	92

1 Introdução

Imigrantes europeus trouxeram para as Américas as abelhas melíferas (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera lingustica*, *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera iberica*). A introdução de abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) no continente ocorreu pela capacidade de produzirem maior quantidade de mel. Porém, esta espécie (abelhas africanas) encontrou dificuldades em manter-se na região até alguns indivíduos fugirem de um experimento, em 1957, e hibridizarem-se com abelhas europeias, dando origem ao que hoje conhecemos como abelhas africanizadas (SHERMAN, 1995). A característica comportamental dessas abelhas faz com elas causem frequentemente ataques a seres humanos e animais que ameaçam sua colônia. Os ataques são fatais para as abelhas, mas muito eficientes na proteção da colônia (SHERMAN, 1995; VETTER et al. 1999). As picadas causam dor intensa, edema e eritema imediato no local e reações alérgicas de variados tipos, podendo chegar à anafilaxia (EWAN, 1998).

O veneno de abelhas do gênero *Apis* é uma complexa mistura de substâncias bioativas e não varia entre as espécies, apenas observando-se pequenas diferenças quantitativas de seus compostos (VETTER et al., 1999). Esses componentes tratam-se de aminas biogênicas como histamina, dopamina e norepinefrina, peptídeos ativos como melitina, apamina e o peptídeo degranulador de mastócitos e alguns componentes enzimáticos como a fosfolipase A2 e hialuronidases (HABERMANN, 1972; PEIREN et al., 2005, VETTER et al., 1999). Duas proteínas destacam-se: o peptídeo melitina, que compõe cerca de 50% do peso seco do veneno e a enzima fosfolipase A2, que representa 10-12% da massa do veneno bruto (HABERMANN, 1972; PEIREN et al., 2005; VETTER et al., 1999).

A fosfolipase A2, dentre as enzimas que compõe o veneno, é a proteína mais estudada, principalmente pelo seu alto potencial imunogênico e vem sendo usada em estratégias para imunização e dessensibilização (JONES et al., 1999). Possui atividade neurotóxica e causa necrose muscular pela capacidade de alterar membranas celulares (OWNBY et al., 1997; GRISOTTO et al., 2006). Demonstrou-se ainda que a enzima reduz a atividade dos fatores de coagulação, trombina, fator V e

fator VIII, servindo como parâmetro para monitoramento de envenenamentos (PETROIANU et al., 2000). O seu poder como alérgeno, confere IgE específica para fosfolipase A2 em 78% dos pacientes alérgicos e, dessa forma, torna-se o principal componente alérgeno do veneno de abelha, seguido da hialuronidade (MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2000; WINNINGHAM et al., 2004). Quando é injetada juntamente com o veneno, sofre interferência de outros componentes e o peptídeo melitina potencializa as propriedades da fosfolipase A2, principalmente a atividade catalítica (MINGARRO et al. 1995).

Melitina

A melitina é o componente majoritário do veneno de abelha *Apis mellifera* representando cerca de 50% do seu peso seco (HABERMAN, 1972). Com apenas 26 aminoácidos em sua conformação, fórmula molecular $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ e massa molecular 2846.46 daltons (Figura 1), é a toxina mais ativa do veneno. Quando armazenada na vesícula de veneno, arranja-se de forma tetramérica (Figura 2) diminuindo sua toxicidade. Entretanto, quando o veneno é liberado, dissocia-se e sua forma monomérica passa a ter uma alta toxicidade (CARDOSO et al., 2003). Sua estrutura terciária altera-se em função do meio, formando uma hélice perfeita quando em contato com membranas (Figura 3) (GLATTLI et al., 2006; SENGUPTA et al., 2005; YANG et al., 2001).

A atividade hemolítica da melitina é seu efeito biológico mais característico e esta atividade é modulada pela presença do colesterol em eritrócitos, o que aumenta a capacidade hemolítica (RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2005). Ainda tem capacidade de extravasar o conteúdo de leucócitos e mastócitos (HABERMANN, 1972). Essa capacidade lítica não se restringe apenas às células animais, uma vez que o peptídeo apresenta também capacidade antibacteriana e antifúngica (ASHTHANA et al., 2004; HABERMANN, 1972). Essas características líticas são explicadas principalmente pela sua elevada capacidade de interagir e desestabilizar membranas (DEMPSEY, 1990; HABERMANN, 1972). A inserção em membranas provoca a formação de poros e a permeabilização das mesmas, o que cursa com rompimento celular (DEMPSEY, 1990; YANG et al., 2001).

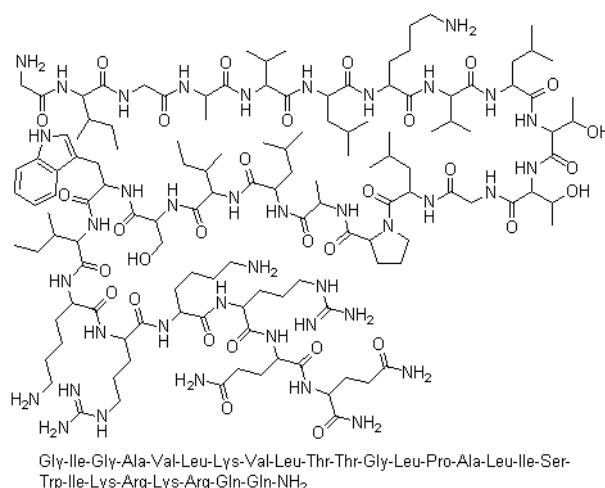


Figura 1. Estrutura química da melitina e a sequência exata de seus 26 aminoácidos
Extraído de [http://www.chemblink.com/products/20449-79-0.htm]

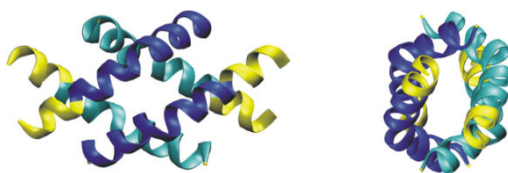


Figura 2. Estrutura tetramérica de melitina (vista frontal e lateral)
Adaptado de Terra et al. (2006)

Apamina

Outro peptídeo bioativo presente na composição do veneno de abelha é a apamina, que corresponde a cerca de 2% do peso seco. É a menor neurotoxina conhecida, com apenas 18 aminoácidos, fórmula molecular C₇₉H₁₃₁N₃₁O₂₄S₄ (Figura 4), massa molecular 2027.34 daltons. Age 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).

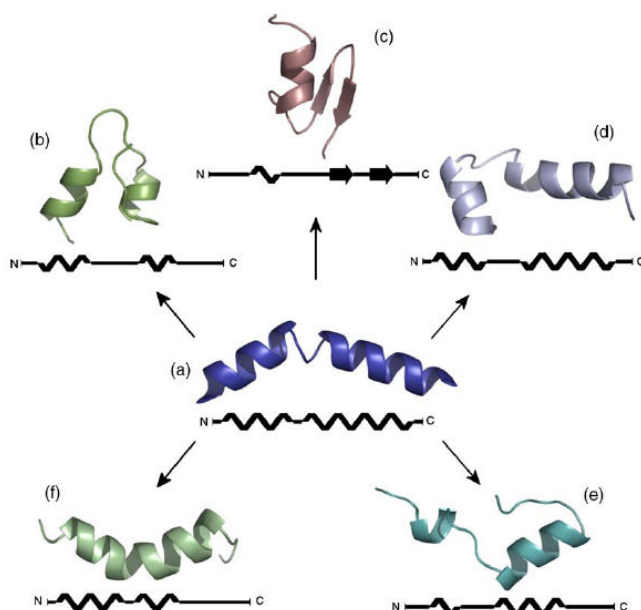


Figura 3. Conformações do arranjo monomérico da melitina. (a) estrutura sem alterações; (b) metina em água pH 7.0, Cl^- 50mM; (c) melitina em água pH 7.0, SO_4^{2-} 50mM; (d) melitina em água pH 7.0, Cl^- 1.2 M; (e) melitina em água pH 7.0, SO_4^{2-} 1.2 M; (f) melitina em água pH 11.0, SO_4^{2-} 50mM.

Adaptado de Terra et al. (2006)

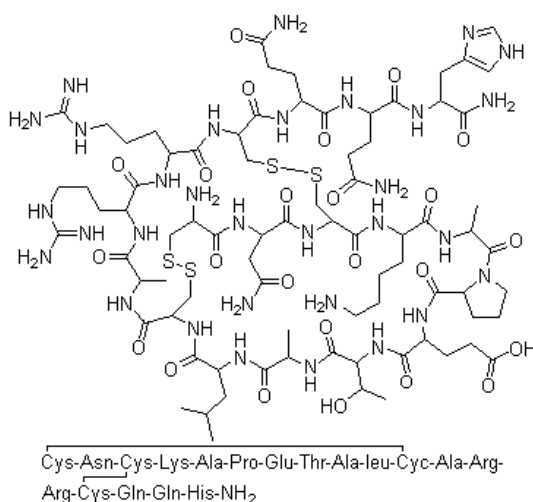


Figura 4. Estrutura química da apamina e a sequência exata de seus 18 aminoácidos

Extraído de [<http://www.chemblink.com/products/24345-16-2.htm>]

Com o interesse da indústria farmacêutica em novos produtos, as pesquisas se amplificaram ao redor do mundo nas últimas décadas e a inesgotável fonte de produtos naturais têm revelado diversos grupos de compostos químicos com funções biologicamente ativas e, muitos deles com ação antimicrobiana. 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 e dificuldades em diversos tratamentos pela resistência microbiana aos fármacos (HARVEY, 1999).

Com o objetivo de contribuir nas novas descobertas de substâncias com ação biológica, este estudo foi dividido em três partes: a primeira objetiva avaliar a toxicidade da melitina e apamina (artigo 1 e artigo 2). A segunda visa avaliar a capacidade antiviral e virucida sobre herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina (artigo 3). Por fim, a terceira parte trata-se da avaliação antibacteriana e antibiofilme contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (artigo 4).

2 Hipótese

Apamina e/ou melitina são substâncias que provocam alterações morfo-fisiológicas em células e apresentam poder antimicrobiano.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações morfo-fisiológicas e as capacidades antivirais, antibacteriana e antibiofilme da apamina e melitina.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a dose tóxica da apamina e melitina para células *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK);
- Caracterizar as alterações morfofisiológicas celulares após tratamento com apamina e/ou melitina por ensaio MTT, citometria de fluxo e microscopia confocal;
- Avaliar a atividade antiviral e virucida da apamina e melitina frente ao herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina;
- Avaliar a atividade antibacteriana da apamina e melitina frente a algumas bactérias de interesse médico-veterinário;
- Avaliar a atividade antibiofilme da apamina e melitina frente a alguma bactérias formadoras de biofilme importantes em medicina veterinária.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Sensibilidade de linhagens celulares frente à melitina isolada de veneno de abelha

PICOLI, Tony; PICH, Cloé Schiavon; LOPES, Matheus Gomes; TEIXEIRA, Alessandra Goulart; FISCHER, Geferson

Publicado na revista Science and Animal Health

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

SENSIBILIDADE DE LINHAGENS CELULARES FRENTE À MELITINA ISOLADA DE VENENO DE ABELHA

PICOLI, Tony¹;

PICH, Cloé Schiavon²;

LOPES, Matheus Gomes³;

TEIXEIRA, Alessandra Goulart⁴;

FISCHER, Geferson⁵.

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel; ²Técnica laboratorial, Laboratório de Virologia e Imunologia, UFPel; ³Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel; ⁴Graduanda em Medicina Veterinária, UFPel; ⁵Professor Adjunto do Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel

RESUMO

O estudo da composição e dos efeitos do veneno de abelha têm revelado efeitos farmacológicos, terapêuticos e antimicrobianos e influencia a análise de seus constituintes de maneira isolada. Melitina, o principal componente da apitoxina, foi avaliada quanto à sua toxicidade frente à diferentes linhagens celulares. Para tanto, células MDBK, MDCK, CRFK, RK13 e Vero foram cultivadas e submetidas à exposição com melitina em concentrações que variaram de 1 a 10 µg/mL para obtenção das concentrações citotóxicas para 50% e 90% dos cultivos celulares (CC₅₀ e CC₉₀, respectivamente) através da avaliação de viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT. Cultivos foram preparados e tratados com as CC₅₀ e CC₉₀ e permaneceram expostos por diferentes períodos quando novamente tiveram sua viabilidade celular avaliada pelo mesmo método. As CC₅₀ e CC₉₀ (µg/mL) foram, respectivamente: MDBK (2,3 e 2,7), MDCK (2,8 e 3,2), CRFK (3,3 e 3,7), RK13 (4,1 e 4,7) e Vero (3,7 e 4,2). Com 5 minutos de exposição à sua CC₅₀ de melitina, apenas a viabilidade celular de células CRFK e Vero não tiveram diferença estatística quando comparadas ao controle de células. Nos demais períodos avaliados, a viabilidade celular de todas as linhagens apresentou-se inferior ao controle de células (p<0,05), diminuindo a viabilidade em função do aumento do tempo de exposição e da concentração. Concluiu-se que melitina apresenta alta toxicidade, dependente do tempo e concentração.

Palavras-chave: Viabilidade celular. Apitoxina. MTT

INTRODUÇÃO

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas é proveniente da natureza, seja do reino vegetal, animal ou mineral. Atualmente, com as técnicas disponíveis, seria impossível a mensuração da variedade e da complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos secundários de organismos do reino animal ou vegetal. Esta enorme diversidade é consequência direta de milhões de anos de evolução dos organismos, o que levou a um elevado número de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Algumas espécies de abelhas são capazes de produzir e injetar apitoxina em prol da defesa de sua colmeia. Esta apitoxina é o próprio veneno, que é composto por um complexo único de componentes e 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 diversos componentes biologicamente ativos, incluindo enzimas, peptídeos e aminas biogênicas, que conferem uma ampla variedade de propriedades farmacológicas, como ações anti-inflamatórias, antivirais e antitumorais (TERWILLIGER; EISENBERG, 1982; MULLER et al., 1997; GLÄTTLI et al., 2006; DE ABREU et al., 2010).

Os estudos sobre a composição e o modo de ação do veneno de abelhas melíferas se intensificaram a partir da década de 1950. Três classes de componentes protéicos são responsáveis pela toxicidade do veneno: enzimas (fosfolipases A2 e hialuronidase), grandes peptídeos (melitina, apamina e peptídeo degranulador de mastócitos) e pequenas moléculas (peptídeos e aminas biogênicas), que possuem atividades alérgicas e farmacológicas (CARDOSO et al., 2003).

A melitina é um conhecido peptídeo tóxico, solúvel em água, presente no veneno de abelhas melíferas, compreendendo aproximadamente 50% de seu peso seco (HABBERMAN, 1972; CRUZ-LANDIM et al., 2002). Com apenas 26 aminoácidos em sua conformação, é a toxina mais ativa do veneno e, quando armazenada na vesícula específica, arranja-se de forma tetramérica diminuindo sua toxicidade (CARDOSO et al., 2003). Entretanto, quando o veneno é liberado, dissocia-se e, individualmente, sua forma monomérica passa a ter uma alta toxicidade. Ainda, quando associada à fosfolipase A2, também presente na apitoxina, tem

sua ação amplificada e modula a ação das fosfolipases, aumentando suas ações catalíticas (CARDOSO et al., 2003; KOUMANOV et al., 2003).

A melitina, embora possua atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral (BROWN et al., 1980; GLÄTTLI et al., 2006; HABERMANN, 1972; TERWILLIGER; EISENBERG, 1982), possui também rápida ação citolítica, desestabilizando membranas celulares e liberando conteúdo citoplasmático de diversos tipos celulares (DEMPSEY, 1990). A atividade hemolítica da melitina é seu efeito biológico mais característico, usado para identificação do peptídeo em frações de veneno (TOSTESON et al., 1985), e a capacidade lítica não se restringe à células animais, uma vez que apresenta capacidade antibacteriana e antifúngica (ASHTHANA et al., 2004).

O Código de Nuremberg estabelece que antes de administrar qualquer novo fármaco ao ser humano, deve-se conhecer: composição química, método de preparação e grau de pureza; testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* em diferentes espécies animais; análise patológica em diversos órgãos animais; absorção, excreção e concentração nos tecidos, bem como se ocorre interação com outros medicamentos e alimentos (LIMA et al., 2003; CALIXTO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008). Já os comitês de ética e experimentação animal também aconselham testes *in vitro* antes da utilização em animais, visando o bem estar e diminuindo o número de animais em experimentação. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a citotoxicidade da melitina purificada de veneno de abelha em cinco diferentes linhagens celulares provenientes de animais: Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK, células renais de bovino), Madin-Darby Canine Kidney (MDCK, células renais de canino), Crandell Rees Feline kidney (CRFK, células renais de felino), Rabbit Kidney (RK13, células renais de coelho) e African Green Monkey Kidney (Vero, células renais de macaco verde africano).

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Melitina foi adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) com pureza de 85% e dissolvida utilizando tampão salina-fosfato estéril pH 7,2 (PBS) como diluente, sendo estocada na concentração de 1 mg/mL em alíquotas de 50 µL sob temperatura inferior a -

70°C. As diferentes concentrações dos compostos utilizados nos experimentos foram realizadas diluindo o produto em Meio Essencial Mínimo (E-MEM, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) suplementado com antibióticos: penicilina (Sigma-Aldrich®, USA), estreptomicina (Vetec®, Brasil), enrofloxacina (Bayer®, Brasil) e anfotericina B (Cristália®, Brasil) a partir dessa solução estocada.

Células MDBK, MDCK, CRFK, RK13 e Vero foram adquiridas do banco de células do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas e permaneceram em ampolas estocadas em nitrogênio líquido até o momento do uso. Meio E-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY) foi utilizado para o cultivo celular em microplacas de poliestireno com 96 cavidades de fundo chato (KASVI®, Brasil). Dimetilsulfóxido (DMSO) e reagente MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) para testes de viabilidade celular também foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

Cultura de células

As linhagens celulares foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultivo celular contendo E-MEM suplementado com SFB, hermeticamente fechadas e mantidas em estufa sob temperatura de 37°C. Para o cultivo celular em microplacas, células em fase exponencial de crescimento foram diluídas em E-MEM suplementado com 10% de SFB até alcançar a concentração de 3×10^4 células/mL e transferidas para microplacas com 96 cavidades (100 µL/cavidade). Após 24 horas em estufa úmida 37°C com 5% de CO₂ e confluência do tapete celular aproximada de 80%, os cultivos estavam prontos para os experimentos. As células utilizadas em todas as etapas encontravam-se em fase exponencial de crescimento.

Ensaio de citotoxicidade

Após crescimento celular, o meio foi cuidadosamente aspirado e melitina foi acrescida aos poços (100 µL/poço) nas diferentes concentrações (1 a 10 µg/mL). As placas permaneceram novamente em estufa úmida por 24 horas. Como controles foram utilizadas células das cinco linhagens, mantidas em E-MEM suplementado, sem nenhum tipo de tratamento. O

ensaio de redução do MTT foi utilizado para determinação da viabilidade celular após os tratamentos, segundo Mosmann (1983), com pequenas modificações.

Após a incubação com os tratamentos, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e foram transferidos 50 µL/poço de solução MTT a 1 mg/mL e as placas novamente foram incubadas sob as mesmas condições por 4 horas. Após, o sobrenadante foi removido e transferidos 100 µL/poço de dimetilsulfóxido para solubilização dos sais de formazan gerados. Depois de 15 minutos de agitação constante as placas foram submetidas à espectrofotometria e as absorbâncias foram calculadas sob comprimento de onda de 492 nm. As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas através da fórmula $AT/AC \times 100$, onde AT e AC indicam respectivamente a absorbância obtida dos poços com células tratadas e absorbância obtidas nos poços com células controle. A Concentração citotóxica para 50% e 90% dos cultivos celulares (CC_{50} e CC_{90} , respectivamente) foi calculada pela fórmula de Reed e Muench (1938). Os testes foram realizados com dez repetições.

Após a obtenção das CC_{50} e CC_{90} de melitina perante as linhagens celulares estudadas, novas microplacas foram utilizadas para cultivo celular nas mesmas condições anteriormente descritas e, após confluência do tapete celular e retirada do meio dos poços, 100 µL das CC_{50} e CC_{90} de melitina para cada célula foram transferidos em sextuplicata sobre os tapetes celulares. Esses tratamentos mantiveram-se em contato com as células por 5, 10, 15 minutos, uma e duas horas. Após esses períodos, as placas foram submetidas ao ensaio de redução do MTT para avaliar a viabilidade celular.

Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio de análise de variância com comparação entre médias através do teste LSD e adotou-se um nível de significância de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As CC_{50} e CC_{90} de melitina para as linhagens celulares estudadas encontram-se dispostas na Tabela 1. Ao microscópio óptico invertido, as células apresentaram-se com tamanho reduzido e aspecto arredondado, com posterior perda de aderência. A intensidade desses sinais foi proporcional à concentração de melitina utilizada. Nas concentrações mais elevadas de melitina (acima de 7 µg/mL), gradativamente houve destruição de células, sendo impossível identificá-las.

As taxas de morte celular encontradas em todas as linhagens celulares tratadas com melitina apresentaram-se com características dose-dependente, concordando com diversos autores (MAHER; MCCLEAN, 2006, 2008; OWNBY et al., 1997; PRATT et al., 2005; SU et al., 2001; CERNE et al., 2013). Conforme esperado, as menores taxas de morte celular foram encontradas nas menores concentrações testadas, aumentando gradativamente conforme a concentração de melitina.

Tabela 1. Concentrações citotóxicas 50% e 90% de melitina para linhagens celulares

Linhagem celular	Melitina ($\mu\text{g/mL}$)	
	CC ₅₀	CC ₉₀
MDBK	2,3	2,7
MDCK	2,8	3,2
CRFK	3,3	3,7
RK13	4,1	4,7
Vero	3,7	4,2

Zhou et al. (2013), ao tratar células HepG2 com melitina, encontraram CC₅₀ de 2,11 $\mu\text{g/mL}$ sob incubação de 24 horas e 1,85 $\mu\text{g/mL}$ sob incubação de 48 horas, demonstrando também uma característica tempo-dependente. Esses autores ainda comprovaram a atividade tóxica de melitina dose-tempo-dependente, realizando tratamento das células com 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de melitina e obtiveram taxas de inibição do crescimento celular de, respectivamente, 15,18%, 21,73%, 47,72%, 85,54% e 93,54% quando tratadas por 24 horas e 19,20%, 26,49%, 55,27%, 92,08% e 95,91% quando tratadas por 48 horas. Entretanto, Hu et al. (2006) já havia descrito efeito citotóxico dose-tempo-dependente do veneno de abelha íntegro ao usá-lo como tratamento em células e realizar avaliação através da redução do MTT.

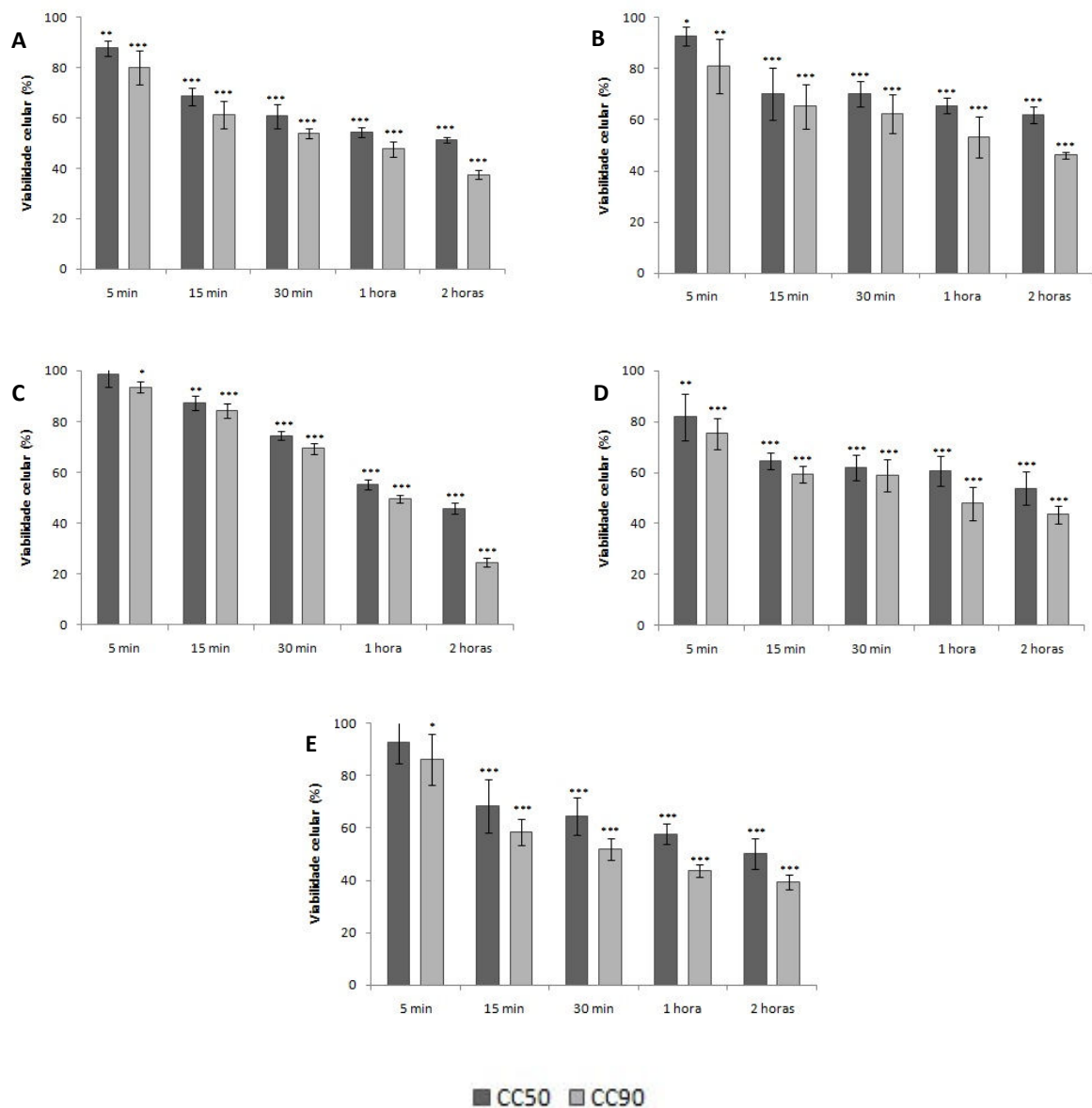
Jo et al. (2012) relatam que a administração de veneno de abelha (1-5 $\mu\text{g/mL}$) e de melitina (0,5-2 $\mu\text{g/mL}$) inibiu de modo dose-dependente a proliferação de células cancerosas ovarianas (linhagens SKOV3 e PA-1). Esses autores afirmam que veneno de abelha inibiu o crescimento de células SKOV3 com CC₅₀ de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e, melitina inibiu com CC₅₀ de 3,8 $\mu\text{g/mL}$. O crescimento de células PA-1 foi inibido com CC₅₀ de 1,2 $\mu\text{g/mL}$ de apitoxina íntegra e com CC₅₀ de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ de melitina isolada de apitoxina.

A ação de melitina sobre as células concentra-se sobre as membranas lipídicas, causando permeabilização, formação de poros artificiais, rompimento e lise (LADOKHIN; WHITE, 2001; RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2007; LEE et al., 2008; ZHANG et al., 2011). A interação de melitina com as membranas fosfolipídicas foi primeiramente descrita por Terwilliger et al. (1982b) e comprovada por diversos autores com os mais variados experimentos (YANG et al., 2001; GÓMARA et al., 2003; WU et al., 2011; LEE et al., 2013). Os mecanismos de atuação propostos sobre as membranas foram denominados "modelo barril" e "modelo carpete". O primeiro, através de agregados de melitina formados perpendicularmente à superfície da membrana, forma rupturas em formato toroidal (em forma de barril). O "modelo carpete", cursa com uma grande quantidade do peptídeo que se distribui paralelamente na superfície da membrana e interage eletrostaticamente com as cabeças dos lipídeos, desorganizando a bicamada lipídica de modo semelhante a um detergente e, dessa forma, causa permeabilização (GORDON-GROSSMAN et al., 2012; GORDON-GROSSMAN et al., 2009; OREN; SHAI, 1998; BENACHIR; LAFLEUR, 1995; BECHINGER, 1999).

Lu et al. (2013) estudaram o comportamento dinâmico de bicamadas lipídicas quando interagem com melitina e os resultados demonstraram que após as interações com a membrana, há a liberação de lipídeos e o rompimento da curvatura natural da bicamada. Isso leva a uma micelização dos lipídeos liberados e, assim, a célula passa a apresentar aberturas em sua membrana, o que desestabiliza o equilíbrio de íons e líquidos e pode permitir a passagem de moléculas de baixo peso molecular, levando a célula à morte.

Zhou et al. (2013), através de citometria de fluxo, indicaram que células HepG2 tratadas com 0, 1, 2 e 5 µg/mL de melitina durante 24 horas apresentaram taxas de apoptose de 0%, 6,5%, 23,7% e 46,6%, respectivamente. O fluoróforo Annexin V conjugado com isotiocianato de fluoresceína tem afinidade pela fosfatidilserina, um componente fosfolipídico normalmente encontrado no lado citosólico de membranas celulares (JORISSEN et al, 2001) e, quando uma célula passa pelo processo de apoptose, a fosfatidilserina não está mais restrita apenas ao lado interno da membrana e é reconhecida pelo fluoróforo (VERMES et al., 1995). Dessa forma, comprovou-se o poder de melitina de causar a apoptose celular, porém os mesmos autores encontraram taxas de necrose, quando a membrana nuclear também é rompida e iodeto de propídeo se liga ao material genético. Portanto sugere-se que em etapas iniciais da ação de melitina sobre as células, apoptose seja detectada e, em etapas posteriores em função do tempo de exposição, seja detectada necrose celular. Entretanto, análise de

viabilidade celular pelo método da redução do MTT avalia apenas a funcionalidade mitocondrial (MOSMANN, 1983) e processos de apoptose podem estar em andamento e não observados.



Diferença estatística entre os tempos de exposição à CC50 e CC90 de melitina com o controle de células sem tratamento através do teste LSD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Figura 1. Viabilidade de linhagens celulares submetidas ao tratamento com as concentrações citotóxicas 50% e 90% (CC50 e CC90) de melitina em função do tempo de exposição. A- Células MDBK, B- células MDCK, C- células CRFK, D- células RK13, E- células Vero.

A Figura 1 ilustra as taxas de viabilidade celular das linhagens estudadas frente ao tratamento com suas respectivas CC_{50} e CC_{90} de melitina em função do tempo de exposição. Ficam claros os efeitos tóxicos dose e tempo dependentes de melitina já expostos por outros autores em diferentes linhagens celulares (ZHOU et al., 2013; MAHER; MCCLEAN, 2006; MAHER; MCCLEAN, 2008; Jo et al., 2012). Células MDBK expostas por 5 minutos com CC_{50} de melitina apresentaram $87,65\% \pm 3,03\%$ ($p < 0,01$) de viabilidade celular quando comparadas ao controle, e às 2 horas de exposição com CC_{90} apresentaram apenas $37,51\% \pm 3,08\%$ ($p < 0,001$) de viabilidade. Células MDCK submetidas a 15 minutos de exposição com CC_{50} de melitina apresentaram $70,24\% \pm 10,09\%$ ($p < 0,001$) de viabilidade. Células CRFK aos primeiros 5 minutos de exposição sob CC_{50} de melitina apresentou $98,57\% \pm 4,84\%$ ($p > 0,05$) de viabilidade em relação ao controle, porém às 2 horas de exposição frente à CC_{90} de melitina apresentou apenas $24,64\% \pm 1,62\%$ ($p < 0,001$) de viabilidade celular. Células RK13 com apenas 5 minutos de exposição à melitina sob sua CC_{50} apresentaram $81,77\% \pm 9,1\%$ ($p < 0,01$) de viabilidade e aos 15 minutos já apresentava viabilidade de $64,59\% \pm 3,3\%$ ($p < 0,001$). Já células Vero atingiram $50,18\% \pm 6,04\%$ ($p < 0,001$) de viabilidade com 2 horas expostas à CC_{50} de melitina.

As doses utilizadas em nosso experimento não permitem a morte total dos cultivos celulares (CC_{50} e CC_{90}), porém é notória a rápida ação citolítica. Esta rápida ação citotóxica de melitina é corroborada por diversos autores que realizaram estudos em diversos cultivos celulares (LO et al., 1997; WESTON; RAISON, 1998; SU et al., 2001; PRATT et al., 2005; CERNE et al., 2013). Estudos através de microscopia fluorescente demonstrou que linfócitos ovinos e humanos apresentaram permeabilidade da membrana celular em segundos de exposição à melitina em doses que variaram de 4,37 a 35 μM (SU et al., 2001).

Cerne et al. (2013), ao tratar células endoteliais humanas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de melitina, constatou que em apenas 5 minutos de exposição, a viabilidade do cultivo celular foi reduzido a $40,3\% \pm 3,5\%$ ($p < 0,001$), aos 15 minutos a viabilidade foi de pouco mais de 20% e com 60 minutos de exposição à melitina, não foram observadas células viáveis através da técnica de coloração com azul de tripan. A concentração utilizada por esses autores deve-se a experimentos prévios, onde concentrações de melitina superiores a 7 $\mu\text{g/mL}$ causou contrações na artéria coronária de suínos (CERNE et al., 2010). Experimentos já demonstravam o efeito de melitina sobre células endoteliais de aorta de ratos. Com apenas 5 minutos de exposição à melitina (10 $\mu\text{g/mL}$), essas células sofreram alterações não

reversíveis (RAPOPORT et al., 1989). Através de microscopia fluorescente, foi verificado que após 5 minutos de exposição iniciaram-se os primeiros sinais de alterações morfológicas nas células que gradativamente amplificaram-se até a morte de todo cultivo celular tratado com 10 µg/mL de melitina. Os sinais observados englobam encolhimento celular, células com aspecto arredondado, aparecimento de morfologia granular e de vesículas extracelulares ligadas à superfície das membranas externas (CERNE et al, 2013).

Embora melitina apresente toxicidade celular, também apresenta características farmacológicas, terapêuticas e antimicrobiana e, se utilizada em concentrações adequadas, pode representar um peptídeo natural com grandes perspectivas futuras. No entanto, as concentrações citotóxicas e as características dessa toxicidade devem ser o primeiro passo na busca de novos estudos.

CONCLUSÃO

O presente concorda com a literatura que melitina apresenta toxicidade dependente do tempo e da concentração. Em apenas 5 minutos de exposição às CC₅₀ e CC₉₀ de melitina, as linhagens celulares estudadas já apresentaram viabilidade celular inferior ao controle de células e a diferença aumentou conforme o tempo de exposição.

SENSIBILITY OF CELL LINES TO MELITTIN ISOLATED FROM BEE VENOM

ABSTRACT

The study of composition and effects of honey bee venom has showed pharmacology, therapeutic and antimicrobial effects and influences the analysis of its constituents on isolated way. Melittin, the major constituent of apitoxin, was evaluated for its toxicity against the different cells lines. Therefore, cells MDBK, MDCK, CRFK, RK13 and Vero were cultivated and submitted to treatment with melittin in concentrations ranging from 1 to 10 µg/mL to get the cytotoxic concentrations for 50% and 90% of cell cultures. (CC₅₀ and CC₉₀, respectively) by evaluation of the cell viability through MTT reduction assay. New cultures

were prepared and treated with the CC50 and CC90 and were exposed for different times and has your viability was evaluated again by same method. The CC50 and CC90 ($\mu\text{g/mL}$) were, respectively: MDBK (2,3 e 2,7), MDCK (2,8 e 3,2), CRFK (3,3 e 3,7), RK13 (4,1 e 4,7) and Vero (3,7 e 4,2). With only 5 minutes of exposure for its CC50 of melittin, only the cell viability of CRFK and Vero have not statistical difference when compared to cell control. In other periods evaluated, the cell viability of all cell lines showed be less than the cell control ($p < 0,05$), reducing their viability due the increase of time of exposure and the concentration. We conclude that melittin shows high toxicity, depending on the time and the concentration.

Keywords: Cell viability. Apitoxin. MTT

SENSIBILIDAD DE LÍNEAS CELULARES FRENTE A MELITINA AISLADA DE VENENO DE ABEJA

RESUMEN

El estudio de la composición y efectos del veneno de abeja de la miel ha mostrado farmacología, efectos terapéuticos y antimicrobianas e influye a los análisis de sus constituyentes en forma aislada. Melitina, la principal contituent de apitoxina, se evalued por su toxicidad frente a las líneas de células diferentes. Por lo tanto, las células MDBK, MDCK, CRFK, RK13 y Vero fueron cultived y sometidos a tratamiento con melitina en concentraciones entre 1 a 10 mg / ml para obtener las concentraciones citotóxicas para 50% y 90% de los cultivos celulares. (CC50 y CC90, respectivamente) por evaluación de la viabilidad celular a través de ensayo de reducción de MTT. Se prepararon nuevas culturas y tratados con el CC50 y CC90 y se expusieron para diferentes tipos veces y se fue evaluado de nuevo su viabilidad mismo método. La CC50 y CC90 (g / ml) fueron, respectivamente: MDBK (2,3 e 2,7), MDCK (2,8 e 3,2), CRFK (3,3 e 3,7), RK13 (4, 1 e 4,7) y Vero (3,7 e 4,2). Con sólo 5 minutos de exposición por su CC50 de la melitina, sólo la viabilidad celular de CRFK y Vero no tiene diferencia estadística en comparación con el control celular. En otros períodos evaluados, la viabilidad de las células de todas las líneas celulares mostró ser menos que el

control de células ($p < 0,05$), reduciendo su viabilidad debido al aumento del tiempo de exposición y la concentración. Se concluye que la melitina muestra una alta toxicidad, en función del tiempo y la concentración.

Palavras chave: Viabilidade celular. Apitoxina. MTT

REFERÊNCIAS

- ASHTHANA, N.; YADAV, S.P.; GHOSH, J.K. Dissection os antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity bus not antibacterial activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 55042-55050, 2004.
- BENACHIR, T.; LAFLEUR, M. Study of vesicle leakage induced by melittin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1235, p.452–460,1995.
- BECHINGER, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p.157-183, 1999.
- BENTON, A.W.; MORSE, R.A.; STEWART, J.D. Venom collection from Honey Bees, **Science**, v. 142, p. 228-230, 1963.
- BROWN, L.R.; LAUTERWEIN, J.; WUTHRICH, K. High-resolution ^1H -NMR studies of self-aggregation of melittin in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 622, n. 2, p.231–444, 1980.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98- 106, 2008.
- 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
- 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. 550p
- CERNE, K.; ERMAN, A.; VERANIC, P. Analysis of cytotoxicity of melittin on adherent culture of human endothelial cells reveals advantage of fluorescence microscopy over flow cytometry and haemocytometer assay. **Protoplasma**, v.250, n.5, p.1131-1137, 2013.
- CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto, FUNPEC-Editora, 2002.182p.

DE ABREU, R.M.; SILVA DE MORAES, R.L.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v. 41, p.172-755, 2010.

DEMPSEY, C.E. The actions of melittin on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1031, n. 2, p. 143- 161, 1990.

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

GÓMARA, M.J.; NIR, S.; NIEVA, J.L. Effects of sphingomyelin on melittin pore formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1612, n.1, p. 83-89, 2003.

GORDON-GROSSMAN, M.; ZIMMERMANN, H.; WOLF, S.G.; SHAI, Y.; GOLDFARB, D. Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.116, n. 1, p.179–188, 2012.

GORDON-GROSSMAN, M.; GOFMAN, Y.; ZIMMERMANN, H.; FRYDMAN, V.; SHAI, Y.; BENTAL, N.; GOLDFARB, D. A combined pulse EPR and monte carlo simulation study provides molecular insight on peptide-membrane interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.113, p.15128, 2009.

HABERMAN, E. Bee waspvenoms. **Science**, v.177, p. 314-322, 1972.

HU, H.; CHEN, D.; LI, Y.; ZHANG, X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/C nude in-vivo. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 83-89

JO, M.; PARK, M.H.; KOLLIPARA, P.S.; AN, B.J.; SONG, H.S.; HAN, S.B.; KIM, J.H.; SONG, M.J.; HONG, J.T. Anti-cancer effects of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v., 258, n. 1, p. 72-81, 2012

JORISSEN, B.L.; BROUNS, F.; VAN BOTEL, M.P.; PONDS, R.W.; VERTHEY, F.R.; JOLLES, J.; RIEDEL, W.J. The influence of soy-derived phosphatidylserine on cognition in age-associated memory impairment. **Nutritional Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 121-134, 2001

KOUMANOV, K.; MOMCHILOVA, A.; WOLF, C. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type II secretory phospholipase A2. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 10, p. 871-877, 2003.

LADOKHIN, A.S.; WHITE, S.H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1514, n.2, p.253–260, 2001.

LEE, M.T.; HUNG, W.C.; CHEN, F.Y.; HUANG, H.W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5087-5092, 2008.

LEE, M.T.; SUN, T.L.; HUNG, W.C.; HUANG, H.W. Process of Inducing Pores in Membranes by Melittin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. 14243-14248, 2013.

LIMA, J. S.; REZA, D. L.; TEIXEIRA, S.; COSTA, C. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v.16, n.4, p.225-233, 2003.

LO, W.C.; HENK, W.G.; ENRIGHT, F.M. Light-microscopic studies of 3T3 cell plasma membrane alterations mediated by melittin. **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 15-26, 1997.

LU, N.Y.; YANG, K.; LI, J.L.; YUAN, B.; MA, Y.Q. Vesicle deposition and subsequent membrane-melittin interactions on different substrates: A QCM-D experiment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1828, n. 8, p. 1918–1925, 2013.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. **Biochemical Pharmacology**, v.75, n.1, p.1104-1114, 2008.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.71, n.9, p.1289-1298, 2006.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.105-111, 2001.

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

MULLER, U.; FRICKER, M.; WYMAN, D.; BLASER, K.; CRAMERI, R. Increased specificity of diagnostic tests with recombinant major bee venom allergen phospholipase A2. **Clinical & Experimental Allergy**, v.27, n.8, p.915-920, 1997.

PRATT, J.P.; RAVNIE, D.J.; JIANG, X.; OROZCO, B.S.; MENTZER, S.J. Melittin-induced membrane permeability: a non osmotic mechanism of cell death. **In vitro cellular & development biology**, v. 41, p. 349-355, 2005.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. **Bioscience Reports**, v.27, n. 4-5, p.189–223, 2007.

RAPOPORT, R.M.; ASHRAF, M.; MURAD, F. Effects of melittin on endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta. **Circulation Research**, v. 64, n. 3, p. 463-473, 1989

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v.47, p.451–463, 1998.

OWNBY, C.L.; POWELL, J.R.; JIANG, M.S.; ELETCHER, J.E. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**, v.35, n. 1, p.67-80, 1997.

SU, M.; HE, C.; WEST, C.A.; MENTZER, S.J. Cytolytic peptides induce biphasic permeability changes in mammalian cell membranes. **Journal of Immunological Methods**, v.252, n. 1-2, p. 63-71, 2001.

TERWILLIGER, T. C.; WEISSMAN, L.; EISENBERG, D. The structure of melittin in the form I crystal and its implication for melittin's lytic and surface activities. **Biophysical Journal**, v. 37, n. 1, p.353–361, 1982.

TERWILLIGER, T.C.; EISENBERG, D. The structure of melittin: II. Interpretation of the structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 11, p. 6016-6022, 1982.

TOSTESON, M.T.; HOLMES, S.J.; RAZIN, M.; TOSTESON, D.C. Melittin lysis of red cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 87, n.1, p. 35-44, 1985.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELLINGSPERGER, C.; A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995

WESTON, K.M.; RAISON, R.L. Interaction of melittin with a human lymphoblastoid cell line, HMy2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 164-173, 1998

WU, Y.; MA, L.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; CUI, Q.; CHAPMAN, E.R.I. Permeation of styryldyes through nanometer-scale pores in membranes. **Biochemistry**, v. 50, n. 35, p. 7493–7502, 2011.

YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, v. 81, n.3, p. 1475–1485, 2001.

ZHANG, N.Z.; QI, J.X.; FENG, S.J.; GAO, F.; LIU, J.; PAN, X.C.; CHEN, R.; LI, Q.R.; CHEN, Z.S.; LI, X.Y.; XIA, C.; GAO, G.F. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-1*0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic T lymphocyte epitope peptides. **Journal of Virology**, v.85, n. 22, p.11709–11724, 2011.

ZHOU, J.; QI, Y.; DIAO, Q.; WU, L.; DU, X.; LI, Y.; SUN, L. Cytotoxicity of melittin and apamin in human hepatic L02 and HepG2 cells in vitro. **Journal of Toxicology Toxin Reviews**, v. 32, n. 4, p. 60-67, 2013

Autor para correspondência:

Tony Picoli.

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária – Campus Universitário. CEP - 96010-900 – caixa postal 354, Capão do Leão (RS), Brasil.

Email: picolivet@gmail.com

4.2 Artigo 2

Toxicidade *in vitro* da melitina sobre células Madin-Darby Bovine Kidney

Tony Picoli, Antonio Sérgio Varela Júnior, Silvia de Oliveira Hübner, Gilberto D'Ávila
Vargas, Marcelo de Lima, Geferson Fischer

Artigo formatado segundo as normas da UFPel

TOXICIDADE *in vitro* DA MELITINA SOBRE CÉLULAS MADIN-DARBY BOVINE KIDNEY

Tony Picoli¹, Antonio Sérgio Varela Júnior², Silvia de Oliveira Hübner³, Gilberto D'Ávila Vargas³, Marcelo de Lima³, Geferson Fischer³

RESUMO

A melitina é o principal peptídeo bioativo que compõe o veneno de abelhas melíferas e é responsável por grande parte dos efeitos deletérios causados pela inoculação do veneno. Neste estudo foi analisado os efeitos tóxicos da melitina sobre células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) através da técnica de redução do MTT, e citometria de fluxo (apoptose/necrose (annexin V/iodeto de propídeo (IP), funcionalidade de mitocôndrias (rodamina 123), produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (H₂DCF-DA), peroxidação lipídica (C11-BODIPY), e fragmentação de DNA (IP)), e ainda através de microscopia confocal: apoptose/necrose (Annexin V/IP) e fluidez de membrana (merocianina 540 / YO-PRO-1)). A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi de 2,32 µg/mL e a CC₉₀ foi de 2,76 µg/mL. A toxicidade apresentou características dose-dependente e a taxa de morte celular chegou a 78,24 ± 3,59% (p<0,01, n=6) para células MDBK expostas à melitina (10 µg/mL). A citometria de fluxo revelou que a partir da concentração 2 µg/mL de melitina os cultivos celulares expostos apresentaram maior taxa de necrose (p<0,05) e as microfotografias obtidas em microscopia confocal confirmam esses dados. A lipoperoxidação das membranas apresentou-se inversamente proporcional à concentração de melitina, porém à microscopia confocal observou-se maior fluidez de membrana conforme o aumento da concentração. Quanto ao ROS, as células expostas à melitina (2,5 µg/mL) diferiram dos demais tratamentos (p<0,05) aumentando a sua produção. Esta concentração de melitina ainda aumentou a fragmentação de DNA (p<0,05). Existe uma correlação positiva entre lipoperoxidação das membranas com ROS (R=0,3158, p<0,05), funcionalidade mitocondrial (R=0,3149, p<0,05) e apoptose (0,4978, p<0,05). Já as taxas de apoptose apresentaram correlação negativa com células saudáveis (R= -0,7392, p<0,0001) e células em necrose (R= 0,7049, p<0,0001). As análises em citometria de fluxo e microscopia confocal foram essenciais para auxiliar no esclarecimento dos mecanismos de toxicidade da melitina e a peroxidação lipídica parece iniciar os eventos de sua ação sobre as células.

¹ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Brasil. Autor para correspondência: picolivet@gmail.com

² Professor Doutor do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil

³ Professor Doutor do Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, Brasil

palavras-chave: citotoxicidade, veneno de abelhas, peptídeo

ABSTRACT

Melittin is the main bioactive peptide that makes up the venom of honeybees and is responsible for much of the deleterious effects caused by inoculation of the venom. The objective was to analyze the toxic effects of the peptide isolated on Madin-Darby Bovine Kidney cells (MDBK) by MTT reduction technique, analysis in flow cytometry: apoptosis / necrosis (annexin V / propidium iodide (IP), mitochondria functionality (rhodamine 123), production of reactive oxygen species (ROS) (H2DCF-DA), lipid peroxidation (C11-BODIPY) and DNA fragmentation (IP), and by confocal microscopy (apoptosis / necrosis (Annexin V / IP) and membrane fluidity (merocyanine 540 / YO-PRO-1)). The cytotoxic concentration to 50% of the cells (CC₅₀) was 2.32 µg/mL and CC₉₀ was 2.76 mg / ml. The toxicity showed dose-dependent characteristics and cell death rate reached $78.24 \pm 3.59\%$ ($p < 0.01$, $n = 6$) for cells exposed to melittin (10 µg/mL). The flow cytometry reveals that exposed cells to 2 µg/mL melittin showed greater necrosis rate ($p < 0.05$) and the microphotographies obtained on confocal microscopy confirmed these data. The lipid peroxidation of the membranes presented inversely proportional to the concentration of melittin but the confocal microscopy revealed there was greater membrane fluidity with increasing concentration. As for ROS, the exposed cells to melittin 2.5 µg/mL differed from all other concentrations ($P < 0.05$) increasing the production. This concentration of melittin also increased the DNA fragmentation ($p < 0.05$). There is a positive correlation between lipid peroxidation of membranes with ROS ($R = 0.3158$, $p < 0.05$), mitochondrial function ($R = 0.3149$, $p < 0.05$) and apoptosis (0.4978, $p < 0.05$). The apoptosis rates showed a negative correlation with healthy cells ($R = -0.7392$; $p < 0.0001$) and necrotic cells ($R = 0.7049$, $p < 0.0001$). The analysis in flow cytometry and confocal microscopy were essential to assist in the clarification of the melittin toxicity mechanisms and lipid peroxidation seems to start the events of its action on the cells.

keywords: cytotoxicity, bee venom, peptide

INTRODUÇÃO

A apitoxina é composta por um complexo único de componentes, secretada por uma glândula especializada existente nas abelhas operárias e armazenada em uma vesícula até o momento de sua aplicação, mediante ferroadas (BENTON et al., 1963). É uma mistura complexa de compostos nitrogenados, que correspondem a mais de 90% de seu peso seco, contendo diversos componentes biologicamente ativos, incluindo enzimas, peptídeos e aminas biogênicas, que conferem uma ampla

variedade de propriedades farmacológicas, como ações anti-inflamatória, antiviral e antitumoral (TERWILLIGER & EISENBERG, 1982; MULLER et al., 1997; GLÄTTLI et al., 2006; DE ABREU et al., 2010).

Os estudos sobre a composição e o modo de ação do veneno de abelhas melíferas se intensificaram a partir da década de 1950. Três classes de componentes protéicos são responsáveis pela toxicidade do veneno: enzimas (fosfolipases A2 e hialuronidase), grandes peptídeos (melitina, apamina e peptídeo degranulador de mastócitos) e pequenas moléculas (peptídeos e aminas biogênicas), que possuem atividades alérgicas e farmacológicas (CARDOSO et al., 2003).

A melitina é um peptídeo tóxico, solúvel em água, presente no veneno de abelhas melíferas, compreendendo aproximadamente 50% de seu peso seco (HABBERMAN, 1972; CRUZ-LANDIM et al., 2002). Com apenas 26 aminoácidos em sua conformação, é a toxina mais ativa do veneno. Quando armazenada na vesícula de veneno, arranja-se de forma tetramérica diminuindo sua toxicidade (CARDOSO et al., 2003). Entretanto, quando o veneno é liberado, dissocia-se e, individualmente, sua forma monomérica passa a ter uma alta toxicidade. Porém, quando associada à fosfolipase A2, também presente no veneno, tem sua ação amplificada e modula a ação das fosfolipases, aumentando suas ações catalíticas (CARDOSO et al., 2003; KOUMANOV et al., 2003).

A melitina possui rápida ação citolítica, desestabilizando membranas celulares e liberando conteúdo citoplasmático de diversos tipos celulares (DEMPSEY, 1990). A atividade hemolítica é um efeito biológico característico, usado para identificação do peptídeo em frações de veneno (TOSTESON et al., 1985) e a capacidade lítica não se restringe à células animais, uma vez que apresenta capacidade antibacteriana e antifúngica (ASHTHANA et al., 2004).

Objetivou-se, com este estudo, examinar os efeitos tóxicos de melitina, bem como seus efeitos sobre a funcionalidade de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Melitina foi adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) com pureza de 85%. Células MDBK foram adquiridas do banco de células do Laboratório de Virologia e Imunologia, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Meio Essencial Mínimo (E-MEM, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) suplementado antibióticos: penicilina (Sigma-Aldrich®, USA), estreptomicina (Vetec®, Brasil), enrofloxacin (Bayer®, Brasil) e anfotericina B (Cristália®, Brasil), foi utilizado para o cultivo celular em microplacas de poliestireno com 96 cavidades de fundo chato (KASVI®, Brasil) e soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY) foi adicionado quando da necessidade da multiplicação celular. Dimetilsulfóxido (DMSO) e reagente MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) para testes de viabilidade celular também foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

Preparação das soluções padrão

Melitina foi dissolvida utilizando E-MEM estéril como diluente, sendo estocada na concentração de 1 mg/mL sob temperatura inferior a -70°C. As diferentes concentrações utilizadas nos experimentos foram realizadas diluindo o produto em E-MEM a partir dessa solução estocada.

Cultura de células e exposição à melitina

As células MDBK foram mantidas em estufa úmida sob temperatura de 37°C, com 5% de CO₂, em E-MEM suplementado com SFB, penicilina, estreptomicina, enrofloxacin e anfotericina B. Após o estabelecimento da monocamada, quando a densidade celular atingiu confluência de aproximadamente 80%, foram repicadas na proporção 1:3.

Células MDBK foram diluídas em E-MEM suplementado com 10% de SFB até alcançar a concentração de 3×10^4 células/mL e transferidas para microplacas com 96 cavidades (100 µL/cavidade). Após 24 horas em estufa, o meio foi cuidadosamente aspirado e melitina foi transferida aos poços (100 µL/poço) nas diferentes concentrações. Os testes foram realizados em sextuplicata, por 72 horas, sob as mesmas condições até o momento da leitura.

As concentrações utilizadas de melitina foram 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 e 1 µg/mL. Como controles foram utilizadas células mantidas em E-MEM suplementado, sem nenhum tipo de tratamento.

Ensaio de redução do MTT

O ensaio com MTT(3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) foi utilizado para determinação da viabilidade celular após os tratamentos.

Após a exposição à melitina, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e foram transferidos 50 µL/poço de solução MTT a 1 mg/mL. Após, as placas novamente foram incubadas sob as mesmas condições por 4 horas, quando o sobrenadante foi removido para transferência de 100µL/poço de dimetilsulfóxido para solubilização dos sais de formazan gerados. Após 15 minutos de agitação constante as placas foram submetidas à espectrofotometria e as absorbâncias foram calculadas sob comprimento de onda de 492 nm, conforme descrito por Mosmann (1983). A concentração citotóxica (CC) 50% e 90% foram calculadas pela fórmula $(AT/AC) \times 100$, onde AT indica a média das absorbâncias dos poços cujas células receberam tratamento e AC a média dos pços controle cujas células não receberam melitina.

Análises por citometria de fluxo

Para análises em citometria de fluxo foi utilizado Attune Acoustic Focusing Cytometer ® (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados utilizando o programa Attune Cytometric Software v 2.1. Para detecção de populações celulares em todas as análises, as células receberam Hoechst 33342 e foram detectadas pelo fotodetector VL1 (filtro 450/40). As fluorescências de H₂DCFDA (ROS) e rodamina 123 (funcionalidade de mitocôndrias) foram lidas através do fotodetector BL1 (filtro 530/30). A fluorescência de iodeto de propídeo (necrose, fragmentação de DNA e ciclo celular) foi lida através do fotodetector BL3 (filtro 640LP). Dez mil eventos foram analisados por amostra com fluxo de 50 células por segundo. Debris celulares e células agrupadas foram eliminadas baseando-se em gráficos de dispersão gerados pelo software (PETRUNKINA et al., 2005).

Preparação das amostras para citometria de fluxo

Células MDBK cultivadas em placas de 96 cavidades e expostas a quatro concentrações de melitina que variaram de 1,0 a 2,5 µg/mL durante 72 horas, foram submetidas ao corante fluorescente específico para cada análise e então foram tripsinizadas, ressuspensas em 100 µL de E-MEM e conservadas refrigeradas. Aos tubos foram adicionados 5µL da solução de Hoerchst 33342 (10 mg/mL). As amostras permaneceram em ambiente abrigado da luz com temperatura aproximada de 24 °C por 30 minutos. Após isso, foi adicionado 500 µL de tampão salina-fosfato (PBS), as amostras foram homogeneizadas para realização das análises por citometria de fluxo.

Apoptose / Necrose

As análises foram realizadas adicionando os compostos fluorescentes após exposição das células à melitina. Foram adicionados aos poços da placa 2 µL de anticorpo Anexina V conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) por uma hora e iodeto de propídeo (50µg/mL) por 10 minutos. As células foram retiradas da placa e imediatamente colocadas sob refrigeração para leitura em citometro de fluxo. Células normais e viáveis não são marcadas (FITC -, IP -), células apoptóticas externalizam a fosfatidilserina que é reconhecida por Anexina V (FITC +, IP-), e células necróticas são reconhecidas por ter a membrana nuclear rompida e IP ligado ao material genético (FITC-, IP+ e FITC+, IP+).

Funcionalidade de mitocôndrias

A análise foi realizada usando o corante fluorescente rodamina 123 que tem afinidade por mitocôndrias e se concentra nas mitocôndrias mais ativas (com maior potencial eletroquímico). Após a exposição das células MDBK à melitina, rodamina 123 (100 nM) foi adicionado sobre o tapete celular e permaneceu durante uma hora, quando foi aspirado e as células tripsinizadas e ressuspensas em 100 µL de E-MEM. Após adicionou-se 5µL da solução de Hoerchst 33342 (10 mg/mL), incubou-se por 30 minutos, acrescentou-se 500 µL de PBS e realizou-se a leitura. As células foram analisadas quanto a intensidade de fluorescência emitida (maior concentração de fluorescência, maior acúmulo de rodamina) e menos ativas (menor fluorescência, menos acúmulo de rodamina). Os dados foram expressos em porcentagens de células acrescidas do erro padrão.

Produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio (ROS)

Para esta análise foi utilizado o corante fluorescente diacetato de 2',7' diclorofluoresceína (H₂DCF-DA), o qual é oxidado por ROS intracelular. O corante H₂DCF-DA (1 mM) foi adicionado às células após a exposição à melitina e permaneceu por uma hora antes dos demais procedimentos para leitura (tripsinização, adição de Hoechst 33342 (10 mg / ml), PBS e leitura). Os dados foram expressos pela média da intensidade da fluorescência verde acrescidos do erro padrão (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2011).

Peroxidação lipídica

O corante fluorescente C11-BODIPY foi adicionado às células após sua confluência em microplacas, porém antes da exposição à melitina, permanecendo por 2 horas, quando foi aspirado e as concentrações de melitina foram adicionadas. Após incubação de 72 horas, as células foram tripsinizadas e submetidas à leitura em citômetro após adição de Hoechst 33342 (10 mg/ml) e PBS.

Fragmentação de DNA

A análise foi realizada utilizando Iodeto de propídeo (50 µg/mL) sobre as células após exposição à melitina durante 10 minutos. O iodeto de propídeo se intercala na dupla fita de DNA e, quando submetido ao laser do equipamento, excita-se e leva a uma fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA na célula.

Microscopia confocal

Células MDBK foram cultivadas sobre lamínula de vidro com espessura 0,13 mm em placas com 24 cavidades. Após estabelecimento da monocamada, as células foram expostas a concentrações de melitina que variaram de 1,0 a 2,5 µg/mL durante 72 horas. Os reagentes específicos foram então adicionados aos poços pelo tempo determinado. Os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e as lamínulas retiradas dos poços da placa com auxílio de uma pinça e foram colocadas em lâmina para análise em microscopia confocal. O equipamento utilizado foi o Microscópio Confocal Invertido de Varredura a Laser, Leica, TCS SP8.

Apoptose/Necrose

Da mesma maneira realizada em citometria de fluxo, as células cultivadas sobre lamínulas em placas com 24 cavidades e expostas à melitina, foram também expostas aos compostos fluorescentes Anexina V + FITC por uma hora e ao iodeto de propídeo (50µg/mL) por 10 minutos. A interpretação do teste se deu da mesma maneira já citada. Na microscopia confocal, é possível a observação dos focos de apoptose, que se apresentam na coloração verde quando há a ligação do anticorpo Anexina V com fosfatidilserina externalizada e há a excitação do FITC. Os focos de necrose são observados na cor vermelha em núcleos que tiveram suas membranas comprometidas, permitindo a passagem do iodeto de propídeo e sua ligação na dupla fita de DNA.

Fluidez de membrana

Para esta análise, após cultivo das células e exposição à melitina, foi utilizado o corante merocianina 540 para indicar fluidez de membrana, pois neste caso o corante se dissemina pelo citoplasma. Além disso, se utilizou o corante fluorescente YO-PRO-1, útil para determinar células viáveis e não viáveis, por penetrar no núcleo celular e marcar DNA quando há fluidez.

Merocianina 540, quando penetra na célula, marca o citoplasma na cor vermelha à microscopia confocal. Células viáveis terão seus núcleos corados em azul e células não viáveis terão núcleos corados em verde. YO-PRO-1 difere do iodeto de propídeo por ter a capacidade de penetrar em células que possuam membrana com morfologia inalterada, embora apresentando desequilíbrios que alterem sua fluidez, ao passo que iodeto de propídeo necessita de membrana lesionada para sua penetração, devido ao seu alto peso molecular.

Análise estatística

Os valores de viabilidade celular obtidos pelo teste MTT estão representados pela média $\pm$ desvio padrão (DP). Foi realizada análise de variância (ANOVA, teste Tukey) através do software BioEstat 5.3[®] para avaliar diferenças entre os grupos de tratamentos e o grupo controle.

As análises realizadas em citometria de fluxo foram avaliadas pelo software Statistix versão 10.0[®] através de análise de variância (ANOVA, teste LSD) para comparação entre os tratamentos. Foi realizada correlações de Pearson para avaliar associações entre as variáveis analisadas.

Em todos os casos foram considerados resultados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade das células tratadas com melitina foi primeiramente avaliada pelo ensaio MTT e as absorbâncias transformadas em taxas de morte celular e comparadas às absorbâncias de células controle não tratadas (Tabela 1). A CI 50% de melitina para células MDBK foi de 2,32 $\mu\text{g/mL}$ e a CI 90% foi de 2,76 $\mu\text{g/mL}$. As taxas de morte celular encontradas chegaram a $78.24 \pm 3.59\%$ ($p < 0.01$, $n=6$) para células MDBK, utilizando concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, com características dose-dependente, concordando com diversos autores (MAHER; MCCLEAN, 2006, 2008; Ownby et al., 1997; Pratt et al., 2005; Su et al., 2001; Cerne et al., 2013). As menores taxas de morte celular foram encontradas nas menores concentrações testadas $0.94 \pm 0.03\%$ ($p > 0.05$, $n=6$).

Os resultados concordam com Zhou et al. (2013) que encontraram $93.54 \pm 1.83\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) de inibição de células HepG2 tratadas com melitina na concentração de 10.0 $\mu\text{g/mL}$, também com correlação diretamente proporcional à concentração utilizada. Maher e McClean (2006) também confirmam uma ação dependente da concentração de melitina em células eucariotas e procariotas ao testar diferentes peptídeos antimicrobianos. Maher e McClean (2008) ainda confirmam a característica de concentração-dependente da melitina ao descrever diferentes mecanismos de ação sobre células gastrointestinais.

Tabela 1. Taxa de morte celular de células MDBK tratadas com melitina e avaliada a partir da redução do MTT

Melitina	Taxa de morte celular (% $\pm$ DP, n=6)
10.0 μ g/mL	78.24 $\pm$ 3.59**
9.0 μ g/mL	74.69 $\pm$ 2.17**
8.0 μ g/mL	71.16 $\pm$ 1.45**
7.0 μ g/mL	71.03 $\pm$ 2.54**
6.0 μ g/mL	70.50 $\pm$ 1.77**
5.0 μ g/mL	71.03 $\pm$ 1.41**
4.0 μ g/mL	69.77 $\pm$ 2.06**
3.0 μ g/mL	58.32 $\pm$ 1.42*
2.0 μ g/mL	0.97 $\pm$ 0.04
1.0 μ g/mL	0.94 $\pm$ 0.03

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Indicam diferença estatística comparado ao controle (0% de morte celular)

DP: Desvio Padrão

As análises em citometria de fluxo revelam danos causados às células que não eram passíveis de observação pelo teste MTT, já que este estima a viabilidade celular apenas pela atividade mitocondrial. Mitocôndrias ativas nem sempre significam saúde celular, visto que as mesmas aumentam sua atividade em casos de injúria celular. A apoptose pode ser iniciada por uma via extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial). A primeira 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 precursor 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).

As taxas de apoptose e necrose, não visualizadas pelo teste MTT mas por citometria de fluxo, estão dispostas na Figura 1. Conforme as células são expostas à maiores concentrações de melitina, as taxas de células em necrose aumentam e, este comportamento demonstra a agressividade da ação de melitina sobre as células já que, uma vez rompida a membrana externa, rapidamente é rompida também a membrana nuclear, permitindo assim a ligação de IP ao DNA celular.

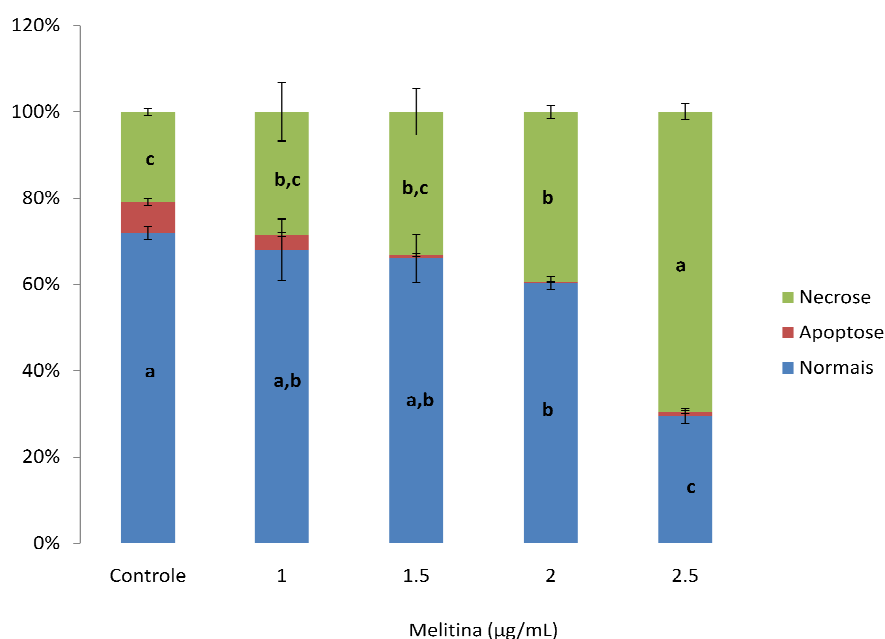


Figura 1. Apoptose e necrose de células MDBK expostas à melitina e analisadas por citometria de fluxo

Annexin V reconhece a externalização de fosfatidilserina em células apoptóticas precoces ou tardias e, com FITC associado, é possível identificar apoptose através de fluorescência. Iodeto de propídeo (IP) se intercala em qualquer DNA e é indicador da integridade de membrana, já que seu peso molecular não permite sua internalização em células com membranas intactas. Dessa forma, pôde-se distinguir diferentes populações de células: células normais com baixos níveis de fluorescência (FITC-, IP-), células em apoptose inicial (FITC+, IP-) e células em necrose (FITC+, IP+).

Com relação às taxas de necrose, as células controle (não tratadas) apresentaram uma taxa de $20.9\% \pm 0.8\%$ de necrose celular. Os tratamentos com 1 e 1.5 µg/mL de melitina não apresentaram diferença do controle. No entanto, houve

39.4% $\pm$ 1.5% de células necróticas quando estas foram tratadas com 2 μ g/mL de melitina, concentração considerada não tóxica pelo teste MTT e, na concentração de 2,5 μ g/mL, a taxa de necrose celular foi de 69.7% $\pm$ 1.8%. Conforme a concentração de melitina aumentou, aumentaram também as taxas de necrose, que apresentou comportamento inversamente proporcional às células normais (FITC-, IP-), como demonstra a Figura 1.

Zhou et al. (2013), ao estudarem os efeitos de melitina sobre células HepG2, derivadas de hepatocarcinoma, utilizando mesma metodologia, encontrou taxas de necrose de 0%, 6.8%, 1.6% e 0.8% para tratamentos utilizando 0, 1, 2 e 5 μ g/mL de melitina, respectivamente, durante apenas 24 horas. Esses valores são a combinação de células necróticas (FITC-, IP+) e de células em apoptose tardia (FITC+, IP+). Nós consideramos os dois grupos de células como um único grupo necrótico, visto que ambos os resultados apresentam ligação de IP com DNA, o que invariavelmente causará necrose celular. Os resultados encontrados por esses autores demonstram taxas menores de toxicidade celular que os encontrados neste estudo, porém deve-se considerar que no presente trabalho, os tratamentos permaneceram em contato com as células durante 72 horas e que as células estudadas por esses autores são provenientes de hepatocarcinoma.

A ação de melitina sobre as células concentra-se sobre as membranas lipídicas, causando permeabilização, formação de poros artificiais, rompimento e lise (LADOKHIN; WHITE, 2001; RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2007; LEE et al., 2008; ZHANG et al., 2011). A interação de melitina com as membranas fosfolipídicas foi primeiramente descrita por Terwilliger et al. (1982b) e comprovada por diversos autores com os mais variados experimentos (YANG et al., 2001; GÓMARA et al., 2003; WU et al., 2011, LEE et al., 2013). Os mecanismos de atuação propostos sobre as membranas foram denominados "modelo barril" e "modelo carpete". O primeiro, através de agregados de melitina formados perpendicularmente à superfície da membrana, forma rupturas em forma de poros toroidais (em forma de barril). O "modelo carpete" cursa com uma grande quantidade do peptídeo que se distribui paralelamente na superfície da membrana e interage eletrostaticamente com as cabeças dos lipídeos, desorganizando a bicamada lipídica de modo semelhante a um detergente e, dessa forma, causa permeabilização (GORDON-GROSSMAN et al., 2012; GORDON-GROSSMAN et al., 2009; OREN; SHAI, 1998; BENACHIR; LAFLEUR, 1995; BECHINGER, 1999).

A Figura 2 representa microfotografias realizadas demonstrando focos de apoptose e necrose em células MDBK. Nota-se focos de necrose mais evidentes nos tratamentos com concentrações de 2 e 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de melitina, confirmando visualmente os resultados obtidos por citometria de fluxo.

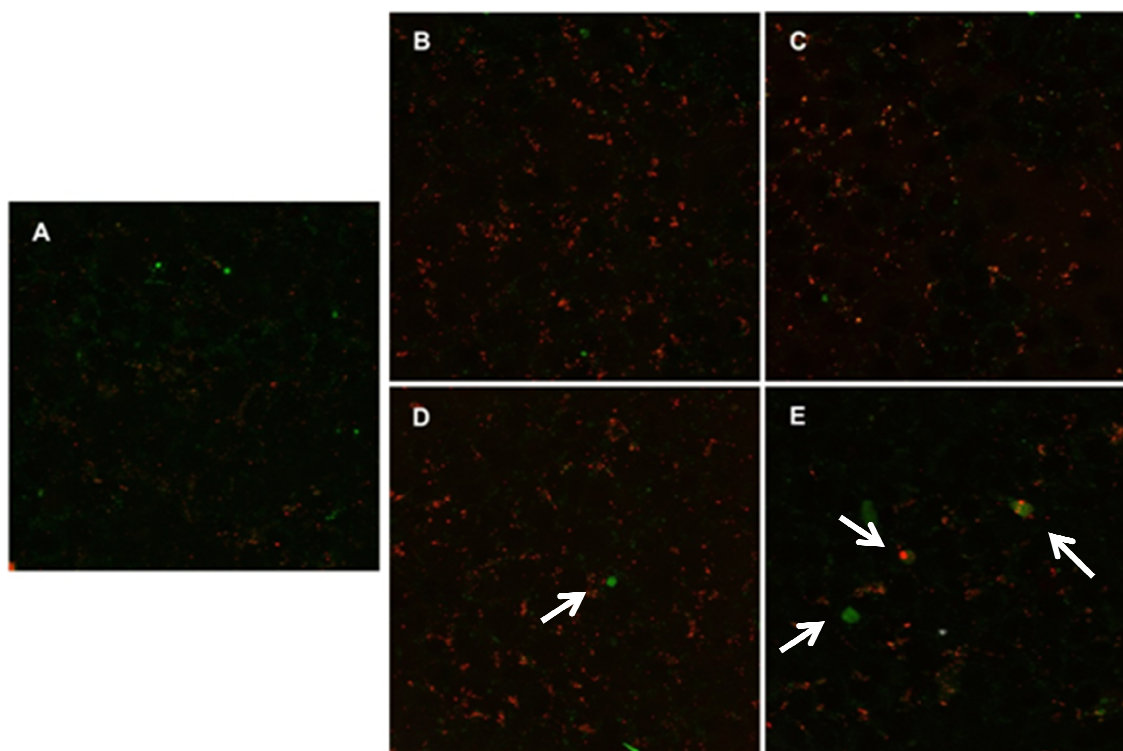


Figura 2. Microfotografias de focos de apoptose e necrose obtidas a partir de microscopia confocal de células MDBK tratadas com melitina. A) controle (sem tratamento), B) 1 $\mu\text{g/mL}$, C) 1.5 $\mu\text{g/mL}$, D) 2 $\mu\text{g/mL}$, E) 2.5 $\mu\text{g/mL}$. As setas indicam focos de apoptose marcados em verde (AnnexinV+FITC ligados à fosfatidilserina) e focos de necrose marcados em vermelho (núcleos corados com iodeto de propídeo).

As demais análises realizadas em citometria de fluxo revelam também alterações não demonstradas pelo teste MTT (Tabela 2).

Nota-se que a peroxidação lipídica das membranas celulares não foi afetada negativamente pelos tratamentos com melitina e, ao contrário do esperado, há uma tendência à diminuição da peroxidação lipídica de membranas quando as células são tratadas com melitina. Os tratamentos com 1 e 1.5 $\mu\text{g/mL}$ não diferiram do

controle nesta análise, ao passo que os tratamentos com as duas maiores concentrações diferiram do controle ($p < 0.05$), porém diminuindo a lipoperoxidação.

Tabela 2. Taxas de peroxidação lipídica de membranas (LPO), quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), taxa de fragmentação de DNA (fragDNA) e potencial elétrico de membrana mitocondrial (MMP) de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) submetidas a tratamentos com melitina em distintas concentrações, obtidas por citometria de fluxo

		LPO (% $\pm$ EP)	ROS (IL $\pm$ EP)	fragDNA (% $\pm$ EP)	MMP (% $\pm$ EP)
Controle		32.04 $\pm$ 1.11 a	17237 $\pm$ 5017.3 b	2.57 $\pm$ 0.77 b	16.07 $\pm$ 0.69 b
melitina (μg/mL)	1	30.28 $\pm$ 1.34 ab	28009 $\pm$ 11155 b	0.6 $\pm$ 0.06 c	16.9 $\pm$ 0.23 ab
	1.5	29.56 $\pm$ 1.31 ab	26580 $\pm$ 17043 b	2.13 $\pm$ 0.43 b	16.87 $\pm$ 0.52 ab
	2	26.87 $\pm$ 0.77 c	21859 $\pm$ 2097.1 b	3.21 $\pm$ 0.69 b	17.8 $\pm$ 0.67 a
	2.5	30.15 $\pm$ 2.27 b	43360 $\pm$ 12289 a	4.8 $\pm$ 0.4a	16.6 $\pm$ 0.56 ab

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0.05$)

EP: erro padrão

No entanto, em análise de fluidez de membrana com auxílio de microscopia confocal, as microfotografias revelam um aumento na fluidez das conforme há o aumento na concentração de melitina nos tratamentos (Figura 3).

Em nosso estudo, a atuação de melitina elevou ou níveis de ROS em células MDBK em todas as concentrações dos tratamentos, embora os três primeiros não tenham apresentado diferença estatística do controle (0 μ g/mL). Já o tratamento com 2.5 μ g/mL (43360 $\pm$ 12289) diferiu estatisticamente ($p < 0.05$) do controle (17237 $\pm$ 5017.3). O aumento dos ROS indicam injúria à célula e, caso o aumento seja exacerbado, o equilíbrio natural entre pró-oxidantes e antioxidantes é afetado, podendo acarretar novas injúrias à célula. Os resultados obtidos nesta avaliação são expressos em intensidade de luminosidade e não em porcentagem.

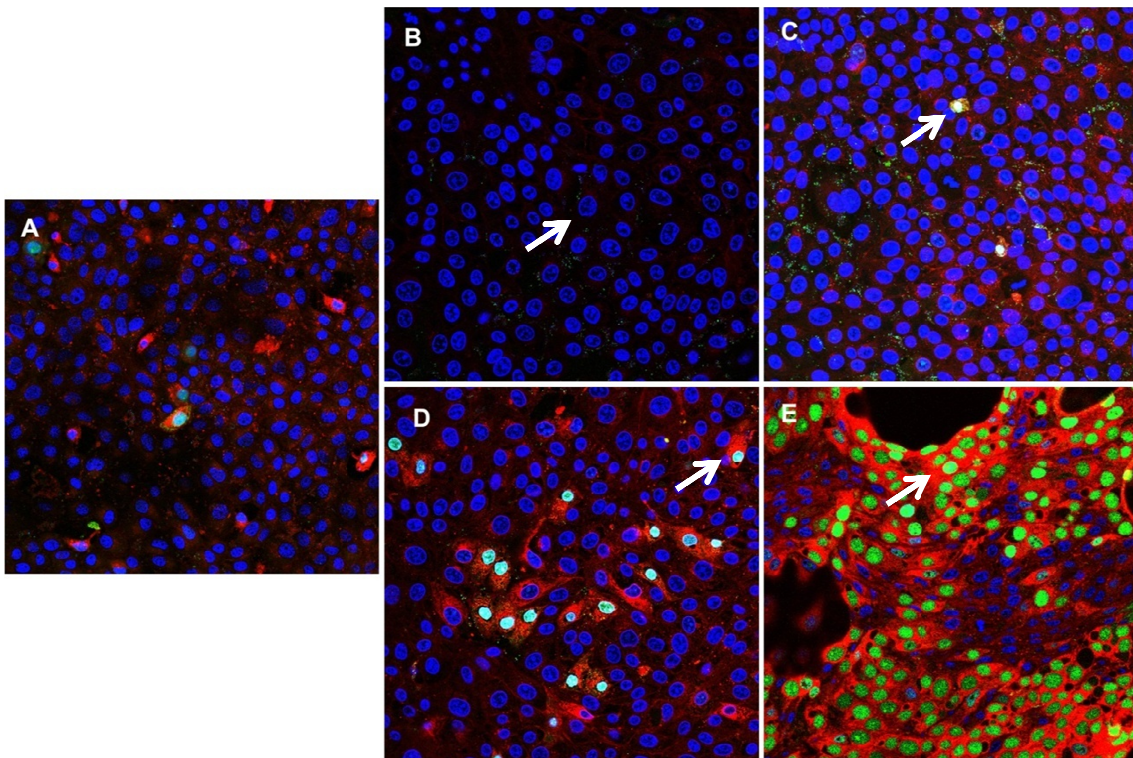


Figura 3. Microfotografias obtidas através de microscopia confocal demonstrando fluidez de membrana em células MDBK tratadas com melitina. A) controle (sem tratatamento), B) 1µg/mL, C) 1.5 µg/mL, D) 2 µg/mL, E) 2.5 µg/mL. Setas indicam focos em vermelho (fluidez de membrana onde o corante se dissemina pelo citoplasma celular), focos em azul (núcleos saudáveis) e focos em verde (núcleos comprometidos)

Mudanças no balanço redox de sistemas biológicos como células, organelas ou tecidos, podem causar o estresse oxidativo (SCHAFFER; BUETTNER, 2001). Esse estresse é causado pelo desequilíbrio entre os pró e antioxidantes no interior da célula (SCHAFFER; BUETTNER, 2001; FINKEL; HOLBROOK, 2000). As espécies reativas ao oxigênio (ROS) são formadas pela célula para combater ameaças, afetam também a própria célula. Além da membrana externa das células, organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático ou núcleo também podem sofrer com a ação dos ROS (WISEMAN, 1996; BARREIROS et al., 2006). O dano celular causado pelos ROS deriva de sua ação DNA, proteínas, lipídeos e açúcares que compõe organelas e membranas celulares.

A fragmentação do DNA foi outra variável avaliada por citometria de fluxo e revela, no tratamento de células MDBK com a maior concentração de melitina ($2.5 \mu\text{g/mL}$), diferença estatística quando comparada ao controle ($p < 0,05$), 4.8 ± 0.4 e 2.57 ± 0.77 , respectivamente (Tabela 2). Nas demais concentrações houve diferença ($p < 0.05$) apenas no tratamento com $1 \mu\text{g/mL}$ de melitina, onde a taxa de fragmentação do DNA ($0.6\% \pm 0.06\%$) foi menor que o controle.

Não há grandes modificações nos padrões do potencial das membranas mitocondriais (MMP). Todos os tratamentos elevaram os MMP de células MDBK, porém há diferença estatística ($p < 0.05$) apenas entre o controle ($16.07\% \pm 0.69\%$) e o tratamento com $2 \mu\text{g/mL}$ ($17.8\% \pm 0.67\%$).

As correlações existentes entre as variáveis estudadas encontram-se na Figura 4. Observa-se que as taxas de apoptose tem correlação negativa com as células normais e com as células em necrose. Já com relação à associação de apoptose com a peroxidação de membranas lipídicas, existe uma correlação positiva ($r = 0.4978$, $p < 0.05$), indicando que a peroxidação leva à apoptose, concordando com a literatura já existente que demonstra a ação citotóxica de melitina ligada à destruição das membranas. LPO ainda apresenta correlação positiva com ROS ($r = 0.3158$, $p < 0.05$) e com MMP ($r = 0.3149$, $p < 0.05$).

A interação de LPO com ROS indica o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à uma injúria nas membranas lipídicas da célula e a associação com MMP indica a maior atividade mitocondrial com objetivo de fornecer energia para a célula trabalhar em seus mecanismos de defesa diante da injúria provoca na membrana.

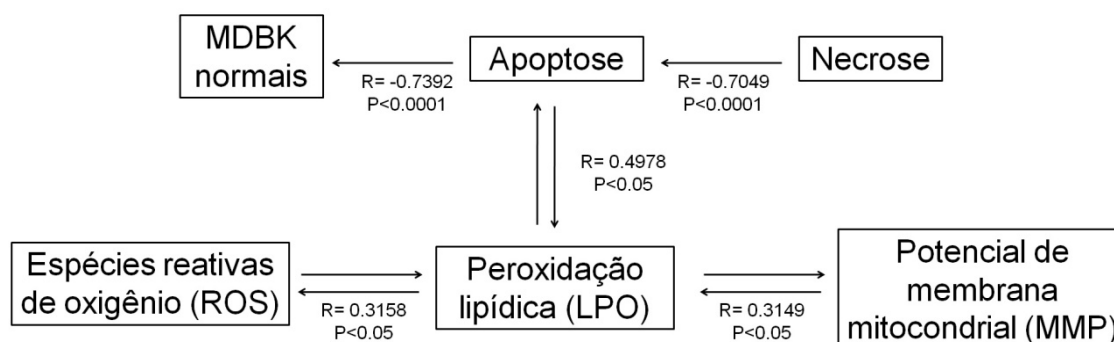


Figura 4. Diagrama de correlações de análises realizadas com células MDBK tratadas com melitina

Fica demonstrado que a peroxidação lipídica representa o início da maioria das alterações celulares apresentadas, concordando com a literatura no que diz respeito ao mecanismo de ação de melitina sobre as bicamadas lipídicas, uma vez que esta estrutura é a primeira a entrar em contato com o peptídeo e, a partir deste primeiro contato, as demais alterações começam a desencadear.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que a peroxidação lipídica da células MDBK parece iniciar todos os outros eventos tóxicos no metabolismo celular. A utilização de diferentes técnicas para avaliar a toxicidade foi essencial para auxiliar a esclarecer os mecanismos de ação tóxicos de melitina e na demonstração da importância de técnicas de apoio ao teste MTT que revela um resultado muitas vezes mascarado pela alta atividade mitocondrial.

REFERÊNCIAS

- ASHTHANA, N.; YADAV, S.P.; GHOSH, J.K. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. **J Biol Chem**, 279, 55042-55050, 2004.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BECHINGER, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta** 1462, 157-183, 1999
- BENACHIR, T.; LAFLEUR, M. Study of vesicle leakage induced by melittin. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1235, p.452-460, 1995.
- BENTON, A.W.; MORSE, R.A.; STEWART, J.D. Venom collection from honey bees. **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 Peçonhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp.(2003).
- CERNE, K.; ERMAN, A.; VERANIC, P. Analysis of cytotoxicity of melittin on adherent culture of human endothelial cells reveals advantage of fluorescence microscopy

over flow cytometry and haemocytometer assay. **Protoplasma**, v.250, n.5, p.1131-1137, 2013.

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 enzymatic activity the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v.41, p.172-175, 2010.

DEMPSEY, C.E. The actions of melittin on membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1031, n. 2, p. 143-161, 1990.

DESAGHER, S.; MARTINOU J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v.10, p. 369-376, 2000.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FENÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 393-403, 2011

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 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, n. 3, p. 255-267, 2006

GÓMARA, M.J.; NIR, S.; NIEVA, J.L. Effects of sphingomyelin on melittin pore formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1612, n.1, p. 83-89, 2003.

GORDON-GROSSMAN, M.; ZIMMERMANN, H.; WOLF, S.G.; SHAI, Y.; GOLDFARB, D. Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.116, n.1, p.179–188, 2012.

GORDON-GROSSMAN, M.; GOFMAN, Y.; ZIMMERMANN, H.; FRYDMAN, V.; SHAI, Y.; BEN-TAL, N.; GOLDFARB, D. A combined pulse EPR and monte carlo simulation study provides molecular insight on peptide-membrane interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.38, p.12687-12695, 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HABERMAN, E. Bee waspvenoms. **Science**, v.177, p. 314-322, 1972.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.

KOUMANOV, K.; MOMCHILOVA, A.; WOLF, C. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type II secretory phospholipase A2. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 10, p. 871-877, 2003.

LADOKHIN, A.S.; WHITE, S.H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1514, n.2, p.253–260, 2001.

LEE, M.T.; HUNG, W.C.; CHEN, F.Y.; HUANG, H.W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n.13, p. 5087–5092, 2008

LEE, M.T.; SUN, T.L.; HUNG, W.C.; HUANG, H.W. Process of Inducing Pores in Membranes by Melittin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. 14243-14248, 2013.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. **Biochemical Pharmacology**, v.75, n.1, p.1104-1114, 2008.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.71, n.9, p.1289-1298, 2006.

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

MULLER, U.; FRICKER, M.; WYMAN, D.; BLASER, K.; CRAMERI, R. Increased specificity of diagnostic tests with recombinant major bee venom allergen phospholipase A2. **Clinical & Experimental Allergy**, v.27, n.8, p.915-920, 1997.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v.47, p.451–463, 1998.

OWNBY, C.L.; POWELL, J.R.; JIANG, M.S.; ELETCHER, J.E. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**, v.35, n.1, p.67-80, 1997.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; WEITZE, K.F.; BEYERBACH, M.; PETERSON, E.T.; WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2278-2299, 2005

PRATT, J.P.; RAVNIE, D.J.; JIANG, X.; OROZCO, B.S.; MENTZER, S.J. Melittin-induced membrane permeability: a nonosmotic mechanism of cell death. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 41, n.10, p. 349-355, 2005.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. **Bioscience Reports**, v.27, n. 4-5, p.189–223, 2007.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SU, M.; HE, C.; WEST, C.A.; MENTZER, S.J. Cytolytic peptides induce biphasic permeability changes in mammalian cell membranes. **Journal of Immunological Methods**, v.252, n.1--2, p. 63-71, 2001.

TERWILLIGER, T.C.; EISENBERG, D. The structure of melittin: II. Interpretation of the structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n.11 ,p. 6016-22, 1982.a

TERWILLIGER. T. C.; WEISSMAN, L.; EISENBERG, D.The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities.. **Biophysical Journal**, v. 37, n. 1, p.353–361, 1982. b

TOSTESON, M.T.; HOLMES, S.J.; RAZIN, M.; TOSTESON, D.C. Melittin lysis of red cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 87, n.1, p. 35-44, 1985.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.7, n.1, p. 2-15, 1996.

WU, Y.;MA, L.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; CUI, Q.; CHAPMAN, E.R.I. Permeation of styryl dyes through nanometer-scale pores in membranes. **Biochemistry**, v. 50, n. 35, p. 7493–7502, 2011.

YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, v. 81, n.3, p. 1475–1485, 2001.

ZHANG, N.Z.; QI, J.X.; FENG, S.J.; GAO, F.; LIU, J.; PAN, X.C.; CHEN, R.; LI, Q.R.; CHEN, Z.S.; LI, X.Y.; et al. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-1*0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic T lymphocyte epitope peptides. **Journal of Virology**, v.85, n.22, p.11709–11724, 2011.

ZHOU, J.; QI, Y.; DIAO, Q.; WU, L.; DU, X.; LI, Y.; SUN, L. Cytotoxicity of melittin and apamin in human hepatic L02 and HepG2 cells in vitro. **Journal of Toxicology Toxin Reviews**, v. 32, n. 4, p. 60-67, 2013

4.3 Artigo 3

Potencial antiviral e virucida da melitina e apamina contra herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina

Tony Picoli, Cristina M. Peter, Gilberto D'Ávila Vargas, Silvia O. Hübner, Marcelo de Lima, Geferson Fischer

Submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Potencial antiviral e virucida da melitina e apamina contra herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina⁴

Tony Picoli^{5*}, Cristina M. Peter⁶, Gilberto D'Ávila Vargas⁷, Silvia O. Hübner⁴, Marcelo de Lima⁴, Geferson Fischer⁴

ABSTRACT.- Picoli T., Peter C.M., Vargas G.D., Hübner S.O., Lima M. & Fischer, G. 2016. [Antiviral and virucidal potential of melittin and apamin against Bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea virus.] Potencial antiviral e virucida da melitina e apamina contra Herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, CEP 96900-010, Avenida Eliseu Maciel, S/N, Jardim América, Capão do Leão, RS, Brazil. E-mail: picolivet@gmail.com

The search for an alternative to synthetic drugs have revealed discoveries in the field of pharmacology and, according to melittin and apamin, two components of bee venom which have been described were with various pharmacological actions. This study aimed to evaluate the *in vitro* antiviral and virucidal capabilities of these components. Therefore, after verification of their toxic doses by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, MDBK cells (Madin Darby Bovine Kidney) have been cultivated in microplates and treated with different concentrations of apamin, melittin and its association. This treatment occurred before and after infection with MOI (multiplicity of infection) 0.1 of cytopathogenic strains of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) strain Los Angeles and bovine viral diarrhea virus (BVDV) strain NADL. After incubation for 72 hours, 37 ° C, the cells were submitted to MTT assay to estimate cell viability. In parallel experiments, plates were subjected to the same procedure suffered freezing and thawing cycle the cells to rupture the same and measurement of viral titers. The virucidal assay was performed by incubating suspension of bovine herpesvirus type-1 and BVDV with apamin solutions, melittin and association for 24 hours at 37 ° C and 22 ° C. The viral titer was evaluated at 0 hours, 1, 2, 4, 8 and 24 hours of incubation. The cytotoxic concentration to 50% of the cells (CC50) of melittin was 2.32 g / ml and apamin did not show toxicity at the greater concentration tested (100 µg / ml). There was antiviral effect of melittin on bovine herpesvirus type-1, especially at a concentration of 2 µg / ml, where was observed 85.96% cell viability when treatment was performed before the infection and 86.78% viability when the treatment was carried out after infection. There was also a 90% reduction of viral particles of bovine herpesvirus type-1. In lower concentrations (1 and 1.5 µg / ml) melittin no antiviral activity because cell viability was low, showing cytopathic effect of the virus. At the association two substances there were a decrease in the title of BVDV and there was higher cell viability when compared to the isolated action of the compounds of this virus. This is confirmed in the virucidal activity, since there was a decrease of 90% of the viral particles of BVDV with the combination of the two compounds of bee venom. Acting individually, melittin showed antiviral effect and virucidal against for BoHV-1, zeroing its title in just 2 hours at 37 ° C. It is concluded that melittin has antiviral and virucidal action against the BoHV-1 and its association with apamin potentiate its effects against BVDV.

INDEX TERMS: antimicrobial, bee venom, BoHV-1, BVDV

RESUMO.- A busca por alternativa aos fármacos sintéticos têm revelado descobertas no campo da farmacologia e, nesse sentido, melitina e apamina, dois constituintes do veneno de abelhas, foram descritas com várias ações farmacológicas. Este estudo objetivou avaliar *in vitro* as capacidades antiviral e virucida destes componentes. Para tanto, células MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*), após verificação das respectivas doses tóxicas por ensaio MTT ((3-(4,5 dimetilthiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo), foram cultivadas em microplacas e tratadas com diferentes concentrações de apamina, melitina e sua associação. Esse tratamento ocorreu antes e após a infecção com 0,1 MOI (multiplicidade de infecção) de cepas citopatogênicas de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) cepa Los Angeles e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) cepa NADL. Após incubação por 72 horas, 37 °C, as células foram submetidas ao ensaio MTT para estimativa da viabilidade celular. Em experimento paralelo, placas que foram submetidas ao mesmo procedimento sofreram ciclo de congelamento e descongelamento das células, para rompimento das mesmas e mensuração dos títulos virais. O ensaio virucida foi realizado incubando-se suspensões de BoHV-1 e BVDV com as soluções de apamina, melitina e associação por 24 horas a 37 °C e 22°C.

⁴ Recebido em _____

Aceito para publicação em _____

⁵ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, CEP 96900-010, Avenida Eliseu Maciel, S/N, Capão do Leão, RS, Brasil. *Autor para correspondência: picolivet@gmail.com

⁶ Residente em Saúde Coletiva UFPel, Campus Capão do Leão, CEP 96900-010, Avenida Eliseu Maciel, S/N, Capão do Leão, RS, Brasil

⁷ Professor Doutor do Departamento de Veterinária Preventiva UFPel, Campus Capão do Leão, CEP 96900-010, Avenida Eliseu Maciel, S/N, Capão do Leão, RS, Brasil

O título viral foi avaliado às 0 horas, 1, 2, 4, 8 e 24 horas de incubação. A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) de melitina foi 2,32 µg/ml e apamina não demonstrou toxicidade à maior concentração testada (100µg/ml). Houve efeito antiviral da melitina sobre BoHV-1, especialmente na concentração de 2µg/ml, onde observou-se 85.96% de viabilidade celular quando o tratamento foi realizado antes da infecção e 86.78% de viabilidade quando o tratamento foi realizado após a infecção. Houve ainda redução de 90% das partículas virais de BoHV-1. Em menores concentrações (1 e 1.5 µg/ml) de melitina não houve atividade antiviral, pois a viabilidade celular foi baixa, demonstrando efeito citopático do vírus. Na associação das duas substâncias houve queda no título de BVDV e observou-se maior viabilidade celular quando comparados à ação isolada dos compostos sobre este vírus. Isso se confirma na atividade virucida, uma vez que houve decréscimo de 90% das partículas virais de BVDV com a associação dos dois compostos do veneno de abelhas. Atuando individualmente, melitina apresentou efeito antiviral e virucida frente ao BoHV-1, zerando seu título em apenas 2 horas a 37°C. Conclui-se que melitina tem ação antiviral e virucida frente ao BoHV-1 e sua associação com apamina potencializou seus efeitos frente ao BVDV.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: antimicrobiano, veneno de abelha, BoHV-1, BVDV

INTRODUÇÃO

A busca por novos agentes farmacologicamente ativos tem levado à descoberta de diversos compostos naturais com propriedades antimicrobianas (Cragg 1997). Os peptídeos antimicrobianos naturais são essenciais na defesa de diversos organismos, microscópicos ou não. Até os dias atuais, mais de 750 compostos protéicos com esta característica foram identificados em bactérias, fungos, vírus, plantas, insetos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, aves, anfíbios, peixes e mamíferos (Cuthbertson et al. 2002, Silva Junior et al. 2002, Zasloff 2002, Brogden et al. 2003). Peptídeos sintéticos podem ser criados para atuar sobre uma diversidade de patógenos simulando ou interagindo com proteínas de superfície conservadas, afim de preservar a eficácia terapêutica. Nos últimos anos, pesquisadores têm explorado diversos métodos para melhorar a tecnologia de síntese e ação desses peptídeos (Fosgerau & Hoffmann 2015). Os mecanismos de ação antiviral de peptídeos incluem principalmente a inibição da penetração viral na célula, destruição do envelope viral e inibição da replicação viral (Skalickova et al. 2015).

A comunidade científica enfrenta novos desafios com relação à vigilância, tratamento e prevenção de viroses emergentes como é o caso das infecções pelos vírus zika, chikungunya e dengue, que vêm causando alerta, principalmente nas Américas (Kantor 2016, Heukelbach et al. 2016, Ministério da Saúde 2016). Essas dentre outras viroses levam à busca por novos antivirais, que por sua vez têm levado à descoberta ou à síntese de compostos que causam euforia momentânea no panorama de enfermidades de difícil tratamento, porém, às vezes, é rapidamente frustrada frente ao rápido aparecimento de cepas resistentes aos novos fármacos, como foi o caso da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), das infecções pelas várias faces do vírus Influenza, assim como diversas outras viroses (De Clercq 2001). De maneira semelhante, permanece insuficiente a disponibilidade dos fármacos antivirais oriundos de produtos naturais, devido à utilidade terapêutica limitada e o grau de toxicidade (Strohl 2000, Faulkner 2002). A busca por um fármaco antiviral estável e de baixa toxicidade deve ser aliada à capacidade de controlar enfermidades que cursem com alta mortalidade ou morbidade. É o caso da rinotraqueíte infecciosa bovina e da diarreia viral bovina, duas enfermidades víricas de importância médico-veterinária, responsáveis por alta morbidade e por vultosos prejuízos financeiros aos produtores rurais, causadas, respectivamente, pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (Flores 2012).

A melitina é um conhecido peptídeo tóxico, anfipático, em hélice com carga positiva localizada em sua porção carboxi-terminal (Bello et al. 1982, Glatti et al. 2006), presente no veneno de abelhas melíferas, compreendendo aproximadamente 50% do seu peso seco (Habberman 1972, Cruz-Landim & Abdalla 2002). Com apenas 26 aminoácidos em sua conformação, é a toxina mais ativa do veneno. Quando armazenada na vesícula de veneno, arranja-se de forma tetramérica diminuindo sua toxicidade (Cardoso et al. 2003). Entretanto, quando o veneno é liberado, dissocia-se e, individualmente, sua forma monomérica passa a ter alta toxicidade e, quando associada à fosfolipase A2, também presente no veneno, tem sua ação amplificada e ainda modula a ação das fosfolipases, aumentando suas ações catalíticas (Cardoso et al. 2003, Koumanov et al. 2003). Possui rápida ação citolítica, desestabilizando membranas celulares e liberando conteúdo citoplasmático de diversos tipos celulares (Dempsey 1990). Esta capacidade lítica não se restringe às células animais, uma vez que apresenta capacidade antibacteriana e antifúngica conhecidas (Ashthana et al. 2004).

Outro peptídeo bioativo presente na composição do veneno de abelha é a apamina, que corresponde a cerca de 2% do peso seco. É a menor neurotoxina conhecida, com apenas 18 aminoácidos, e age nas membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico, bloqueando a transmissão de determinados impulsos inibitórios (Cruz-Landim & Abdalla 2002, Cardoso et al. 2003).

Devido à escassez de informações, este estudo objetivou contribuir com as pesquisas em busca de novos compostos antimicrobianos avaliando o potencial antiviral e/ou virucida da melitina e da apamina frente aos vírus de importância em medicina veterinária, BoHV-1 e BVDV.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais. Melitina e apamina, adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) com pureza de 85% e 99%, respectivamente, foram dissolvidas em tampão salina-fosfato (PBS) estéril pH 7,2 até concentração de 1 mg/ml e estocadas em temperatura inferior a -70°C até o momento do uso. Para ensaios de citotoxicidade, melitina e apamina foram diluídas em Meio Essencial Mínimo (E-MEM, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) atingindo concentrações que variaram de 1 a 10 µg/ml para melitina, e de 10 a 100 µg/ml para apamina. As associações foram elaboradas utilizando doses de melitina e apamina na proporção em que se encontram na apitoxina (melitina- 0,7 a 2,95 µg/ml; apamina- 0,028 a 0,118 µg/ml). Para os ensaios da atividade antiviral, os compostos foram diluídos sem E-MEM até alcançar as concentrações desejadas (melitina: 1 a 4 µg/ml, apamina: 1,25 a 10 µg/ml e sua associação foi utilizada nas proporções em que se encontram no veneno natural, variando de 1 a 4 µg/ml de melitina e 0,04 a 0,16 µg/ml de apamina).

Células da linhagem MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*) foram selecionadas por ser permissíveis aos vírus estudados. Essas células foram cultivadas em E-MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY) e antibióticos penicilina (Sigma-Aldrich®, USA), estreptomicina (Vetec®, Brasil), enrofloxacin (Bayer®, Brasil) e anfotericina B (Cristália®, Brasil) em placas de poliestireno de 96 cavidades (KASVI®, Brasil) em temperatura de 37°C em ambiente com 5% de CO₂, até o estabelecimento de monocamada em concentração de 1 x 10⁷ células/ml.

Os experimentos foram realizados frente à cepas citopatogênicas de BoHV-1, cepa Los Angeles e BVDV, cepa NADL pertencentes ao Laboratório de Virologia e Imunologia Animal - UFPel. Em ambos os casos, quando da necessidade de inoculação, utilizou-se 0,1 MOI.

Ensaio de citotoxicidade. Células MDBK previamente cultivadas em placas de 96 cavidades por 24 horas foram tratadas com as concentrações de melitina, apamina e sua associação (100 µl/poço). Os testes foram realizados em sextuplicata e incubados por 72 horas, sob as mesmas condições até o momento da leitura. Como controles foram utilizadas células mantidas em E-MEM suplementado, sem nenhum tipo de tratamento. Após essas etapas, as placas foram submetidas ao ensaio com o reagente MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) segundo Mosman (1983). Os percentuais de viabilidade celular (CV) foram calculados segundo a fórmula: $CV = AT/AC \times 100$, onde AT e AC significam a absorbância das células tratadas e do controle de células, respectivamente. A concentração inibitória de 50% do cultivo celular (CI50%) e CI 90%, foram obtidas como descrito por Reed & Muench (1938).

Ensaio da atividade antiviral. Os títulos virais estão expressos como doses infectantes para 50% de cultivos celulares (CCID₅₀) e a atividade antiviral foi expressa em percentual de inibição (PI) e calculada através dos títulos virais pela fórmula:

$$\left[1 - \left(\frac{\text{antilog tratamento}}{\text{antilog controle}}\right)\right] \times 100$$

A atividade antiviral foi avaliada através de dois métodos distintos: através da viabilidade celular e do título viral. Cada um dos dois métodos ainda foi testado quanto ao momento da infecção: a) tratamento das células com melitina, apamina ou sua associação antes da infecção, e b) tratamento das células após a infecção. Todas as análises foram realizadas em sextuplicata.

a) Tratamento antes da infecção - células MDBK após 24 horas foram tratadas com 100 µl de cada um dos tratamentos e após 24 horas, o sobrenadante foi removido e sobre as células foi adicionado o vírus (BoHV-1 ou BVDV). Após 72 horas de incubação, a leitura se deu por duas formas distintas: através da viabilidade celular pelo teste MTT e através do título viral através do método de Reed e Muench (1938). As placas destinadas à realização da titulação viral foram congeladas e descongeladas para rompimento de células.

b) Tratamento após infecção- Após crescimento em placas, as células foram infectadas com os vírus por duas horas, quando foi removido, e os tratamentos realizados sobre as células. Após 72 horas foi realizada a leitura da mesma maneira descrita.

Ensaio da atividade virucida. BoHV-1 e BVDV foram incubados 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 temperaturas de 22°C e 37°C. As concentrações selecionadas dos compostos foram baseadas nos resultados dos testes de citotoxicidade. Durante a incubação, em seis momentos (zero, uma, duas, quatro, oito e vinte e quatro horas), foram coletadas alíquotas das suspensões víricas com os tratamentos para realização das titulações virais.

Análise estatística. Foi realizada análise de variância com comparação entre médias pelo teste de Tukey adotando uma significância de 95% como base para afirmar diferenças entre médias. As análises foram realizadas com auxílio do software estatístico BioEstat® versão 5.3.

RESULTADOS

A CC₅₀ de melitina para células MDBK foi de 2,32 µg/ml e a CC₉₀ foi de 2,76 µg/ml. Para apamina, não foi possível estabelecer uma CC₅₀ ou CC₉₀, pois as maiores concentrações testadas atingiram apenas 12.58 ± 0.53% (p>0.05, n=6) de destruição celular.

Quanto aos ensaios antivirais, observa-se na Fig. 1 o efeito de melitina sobre o BoHV-1, especialmente na concentração de 2 µg/ml, em ambas avaliações (tratamento pré e pós infecção). Nesta concentração de melitina, houve destruição em apenas 14.04% ± 3.86% (n=6, p<0.01) das células com tratamento antes da infecção e apenas 13.22% ± 4.41% (n=6, p<0.01) com tratamento pós infecção, se aproximando ao controle de células, que não foi submetido a tratamento ou infecção. As menores concentrações de melitina (0.5 µg/ml e 1 µg/ml) não apresentaram efeito antiviral, uma vez que houve destruição de mais de 50% das células sugerindo que houve ação viral. As maiores concentrações (3 µg/ml e 4 µg/ml) apresentaram destruição celular, provavelmente causada pela toxicidade da própria melitina. Em ambos os tratamentos, a concentração de 2 µg/ml reduziu o título de BoHV-1 de 6.25 CCID₅₀/25µl para 5.25 CCID₅₀/25µl, indicando PI=90%. Com o tratamento pré-infecção na maior concentração testada, o título de BoHV-1 caiu para 4.75 CCID₅₀/25µl (PI=96.8%) e tratamento pós-infecção o título caiu para 4.25 CCID₅₀/25µl (PI=99%).

Quanto à atividade de melitina sobre o BVDV, nas concentrações testadas, a porcentagem de células viáveis variou de 21.69% ± 0.77% a 31% ± 1.27% (n=6, p<0,01) no tratamento pré-infecção, e de 21.29% ± 0.84% a 31.42% ± 1.2% (n=6, p<0,01) no tratamento pós-infecção, indicando que em todos os tratamentos houve efeito citopático causado pelo vírus. Estes dados são confirmados pelo título viral que não apresentou queda marcante em nenhuma das concentrações de melitina testadas. Sendo assim, frente ao BVDV, melitina não apresentou efeito antiviral nas doses testadas.

Apamina, nas doses testadas, não apresentou atividade antiviral frente ao BoHV-1 ou BVDV, havendo queda no título de BoHV-1, de 6.25 para 5.75 CCID₅₀/25µl, PI=68.38% tanto no tratamento pré-infecção como no pós-infecção. No caso de BVDV, o título caiu de 4.25 para 3.75 CCID₅₀/25µl, PI=68.38% com o tratamento pré-infecção e no tratamento pós-infecção, o título caiu de 4.25 para 4 CCID₅₀/25µl em todas as concentrações testadas (PI=43.77%). Em todos os ensaios antivirais com apamina, a viabilidade celular não passou de 49% frente ao BoHV-1 e de 24% frente ao BVDV e, como não foi encontrada dose tóxica de apamina para células MDBK, a baixa viabilidade celular demonstra efeito citopático viral.

A associação de melitina e apamina amplificou a resposta frente aos vírus testados (Fig. 2). Na maior concentração testada, o título de BoHV-1 caiu de 6.3 para 4.25 CCID₅₀/25µl, PI=99.2% em ambos tratamentos (antes e após infecção). No tratamento apenas com melitina, a redução do título foi de 6.3 para 4.75 CCID₅₀/25µl (PI=97.18%). Com o tratamento pré-infecção, na associação C (2 µg/ml de melitina + 0,08 µg/ml de apamina), houve maior viabilidade celular (80.9% ± 1.57%) e o título de BoHV-1 caiu 86.82% em relação ao controle. Com o tratamento pós-infecção, na mesma associação C, houve 79.8% ± 3.09% de viabilidade celular e PI=95.53%. Na associação D, o título de BoHV-1 caiu para 4.6 CCID₅₀/25µl, indicando PI= 98%, demonstrando também, atividade antiviral.

Os resultados mais expressivos que demonstram o aumento da atividade dos compostos quando atuam em associação, estão vinculados aos ensaios frente ao BVDV que, no tratamento pré-infecção, apresentou queda de 1.5 log₁₀ do título viral (PI=96.84%) na maior concentração testada. Na concentração C, onde obteve-se a maior viabilidade celular (53.45% ± 3.13%), o título caiu 0.64 log₁₀ (PI=77.09%), ao passo que, no tratamento apenas com melitina na mesma concentração, a redução do título viral foi de 0.5 log₁₀ e a viabilidade celular não passou dos 31.73% ± 1.09%. Vale ressaltar que o uso apenas de apamina não resultou em atividade antiviral. O tratamento pós-infecção com a associação demonstrou resultados semelhantes, potencializando o efeito das substâncias frente aos vírus testados.

Quanto à atividade virucida de melitina, a Fig. 3 ilustra os resultados obtidos a partir da avaliação do título viral em períodos pré-estabelecidos de contato com melitina, sob duas temperaturas. Houve efeito virucida sobre BoHV-1, que foi totalmente inativado em apenas duas horas de incubação com melitina a 25 µg/ml sob temperatura de 37°C e em quatro horas sob 22°C. Os títulos controle (vírus incubado com PBS, sob ambas temperaturas) variaram de 5.75 CCID₅₀/25µl a 5,16 CCID₅₀/25µl em 24 horas. Melitina, na concentração testada, não apresentou efeito sobre BVDV.

A associação de melitina com apamina (Fig. 4) apresentou efeito virucida frente ao BoHV-1 seguindo o mesmo padrão da melitina atuando individualmente, porém a 37°C o título foi zerado em apenas uma hora de incubação. A associação ainda potencializou a ação contra o BVDV. Sob temperatura de 37°C após 24 horas de incubação, a associação permitiu redução do título de BVDV de 4.5 para 3.5 CCID₅₀/25µl, o que significa uma queda de 90% no número de partículas virais. No mesmo período, o controle demonstrou PI= 74.88%.

Apamina individualmente não apresentou efeitos contra o BVDV. Porém a associação entre as duas substâncias potencializou o efeito sobre este vírus. Nas concentrações testadas, não houve efeito de apamina sobre BoHV-1 ou BVDV.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos com os testes de citotoxicidade corroboram com Zhou et al. (2013) que também relatam a ação dose-dependente da melitina em células HepG2. Quanto à apamina, na dose de 800 µg/ml, esses autores encontraram apenas $34.98 \pm 1.37\%$ ($p > 0.05$, $n=6$) de morte celular, não sendo possível, portanto, o estabelecimento da CC 50%, assim como em nosso estudo. Dessa forma, para as análises da atividade antiviral, foram escolhidas concentrações específicas de trabalho.

Os dois ensaios com BoHV-1 revelaram efeito antiviral na concentração 2 µg/ml de melitina. Esses resultados concordam com nosso estudo citotóxico, onde a CC50 da melitina ficou em 2.32 µg/ml e a CC90, em 2.76 µg/ml. A concentração de 2 µg/ml, por não ser tóxica para as células, demonstra a real influência sobre o vírus e, após infecção e incubação por 72 horas, a quantidade de células viáveis foi superior às demais concentrações, aproximando-se ao controle de células, provando o efeito antiviral contra BoHV-1.

O espectro de vírus que são susceptíveis aos peptídeos catiônicos compreendem basicamente os vírus RNA e RNA envelopados (JENSSSEN et al., 2006) com algumas exceções como os adenovírus não envelopados (Bastian & Schäfer 2001, Horne et al. 2005), calicevírus felino (McCannl et al. 2003) e echovírus (Pietrantonio et al. 2006). Os mecanismos de ação desses peptídeos sobre vírus normalmente se enquadram nos processos de adsorção ou entrada viral na célula (Belaid et al. 2002) ou como resultado de um efeito direto no envelope viral (Aboudy et al. 1994, Robinson et al. 1998).

Assim como a melitina, outros peptídeos com atividades antimicrobianas também são anfipáticos com cargas positivas e vários grupos de pesquisa têm procurado estabelecer uma ligação entre essas características e a atividade antiviral (Daher et al. 1986, Jenssen et al. 2004, Tamamura et al. 1994, Yasin et al. 2000). Giasanti et al. (2005) ao realizarem estudos buscando atividade antiviral de peptídeos derivados da ovotransferrina concluíram que a presença de resíduos hidrofóbicos com carga positiva são importantes mas não o suficiente para determinar a atividade antiviral. Essa atividade pode estar relacionada com diferentes conformações adotadas pelos peptídeos. Yasin et al. (2004) demonstraram a importância da carga e da conformação espacial dos peptídeos ao estudar a proteção celular causada por peptídeos ao inibir a adesão viral de herpes simplex vírus. De maneira semelhante, estudos confirmaram a importância de pontes dissulfeto na atividade antiviral de peptídeos com beta-estrutura (Andersen et al. 2001, Jenssen et al. 2004, Tamamura et al. 1994).

O bloqueio da entrada viral na célula é um dos mecanismos que peptídeos antimicrobianos podem atuar (Jenssen et al. 2006). O sulfato de heparan é a molécula de superfície celular mais importante na adesão viral à célula hospedeira (Mettenleiter 2002, Spillmann 2001) e, bloqueando essa molécula, consequentemente a infecção viral é reduzida (Shieh et al. 1992, Wudunn & Spear 1989). Isso foi demonstrado quando células recombinantes que não expressavam o sulfato de heparan demonstraram 80% de redução na infecção por herpes simplex virus (Mardberg et al. 2002). A remoção enzimática do sulfato de heparan celular também reduziu as infecções por HIV em suas células hospedeiras (Arqyris et al. 2003). O bloqueio da entrada viral à célula também pode ocorrer pela interação do peptídeo com receptores virais específicos na superfície da célula hospedeira, influenciando assim a infectividade e a entrada viral (Tamamura et al. 1996). A atividade antiviral de alguns peptídeos também está relacionada à habilidade de impedir a disseminação viral de uma célula a outra (Jenssen et al. 2006).

Uma vez que os vírus foram capazes de se internalizar na célula, alguns peptídeos têm a capacidade de interagir em alvos intracelulares bloqueando a expressão de genes virais (Wachinger et al. 1998) ou na estimulação de genes e proteínas celulares específicas ao combate da infecção viral (Bowdish et al. 2004). De acordo com essa capacidade de interagir com DNA (Hsu et al. 2005, Song et al. 2005), uma das hipóteses aceitas é a influência direta na síntese de ácidos nucleicos virais, como demonstrado pelos peptídeos polyphemusin T22 e lactoferrin. Alguns peptídeos ainda são capazes de desencadear uma atividade imunomodulatória através de citocinas e interferons (Bowdish et al. 2005, Chang et al. 2005, Scott et al. 2002) que cursam com atividade antiviral. Wachinger et al. (1998) relatou a capacidade de melitina em inibir a produção associada às células infectadas pelo HIV-1 suprimindo a expressão de genes deste vírus.

O rompimento de envelopes virais induzidos por peptídeos ainda é pouco compreendido. Lu et al. (2013) estudaram o comportamento dinâmico de bicamadas lipídicas quando interagem com melitina e os resultados demonstraram que após as interações com a membrana, há a liberação de lipídeos e o rompimento da curvatura natural da bicamada leva a uma micelização dos lipídeos liberados e, assim, o vírus pode ser destruído por aberturas no envelope que permitem a passagem de moléculas de baixo peso molecular.

Sabidamente, melitina atua sobre membranas lipídicas, apresentando uma variedade de efeitos como permeabilização, formação de poros artificiais, rompimento e lise (Ladokhin & White 2001, Raghuraman & Chattopadhyay 2007, Lee et al. 2008, Zhang et al. 2011) e, dessa maneira, pode apresentar efeito sobre envelopes virais. Duas hipóteses são mais aceitas para explicar esses mecanismos: os mecanismos denominados "modelo barril" e "modelo carpete". O "modelo barril" cursa com rupturas em forma de poros toroidais (em forma de barril) formados pela agregação de melitina perpendicular à superfície da membrana e, a destruição ou permeabilização da bicamada lipídica pelo mecanismo denominada "modelo carpete", ocorre quando uma grande quantidade do peptídeo se distribui paralelamente na superfície da membrana interagindo eletrostaticamente com as cabeças dos lipídeos, desorganizando a bicamada lipídica de modo semelhante a um

detergente com consequente permeabilização da mesma (Gordon-Grossman et al. 2012, Gordon-Grossman et al. 2009, Oren & Shai 1998, Benachir & Lafleur 1995, Bechinger 1999).

Em nosso estudo, os efeitos dos peptídeos melitina e apamina, atuando individualmente sobre o BVDV não são marcantes, porém há relatos de descrição de peptídeos com efeito sobre vírus RNA. Hood et al. (2013) demonstraram ação de nanopartículas de melitina sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sugerindo uma ação sobre o envelope viral. Segundo esses autores, a melitina nas nanopartículas se funde com o envelope viral formando pequenos complexos de poros, inativando o vírus. Ainda elucidam que, ao entrar em contato com células saudáveis, as nanopartículas não liberam a melitina. Wachinger et al. (1998) também encontraram ação de melitina livre sobre o HIV, porém com estudos moleculares, detectaram a inibição na síntese de RNA mensageiro. Devido à ação de peptídeos, o vírus Influenza também pode ser inativado por esse mecanismo, assim como pelo rompimento de envelope conforme descrito por Skalickova et al. (2015). RNA-polimerase dependente de RNA viral (RdRp), uma enzima limitante na transcrição e replicação do vírus Influenza é composta por três subunidades (PB1, PB2 e PA). A subunidade PB1 é responsável pela polimerização e clivagem de endonuclease (Ruigrok et al. 2010, Engler et al. 2011), enquanto PB2 é responsável por reconhecer e se ligar ao mRNA (Ma et al. 2011, Fechter et al. 2003) e, a subunidade PA foi recentemente descrita como responsável pela clivagem do pré-mRNA (Dias et al. 2009, Yuan et al. 2009). O complexo RdRp é mantido por meio de ligações não-covalentes e qualquer desestabilização pode ocasionar falha na replicação viral. Li et al. (2011) demonstraram esse mecanismo de ação ao avaliarem a ação de peptídeos frente ao vírus H5N1.

Quando atuam em conjunto, melitina e apamina potencializam os efeitos virucidas, especialmente contra o BVDV e, embora os efeitos dessa associação não tenham sido completamente elucidados, essa potencialização ocorre assim como na associação entre melitina e fosfolipase A2, outro componente enzimático da apitoxina que tem seu efeito regulado e potencializado quando em contato com melitina (Mollay et al. 1976, Saini et al. 1997).

A saúde pública é um tema que exige bastante preocupação nas pesquisas atuais, já que, além da resistência microbiana aos fármacos, existe um apelo por parte da população que vêm exigindo tratamentos menos agressivos ao organismo e, por se tratarem de peptídeos de origem natural, melitina e apamina atendem a essa demanda que é crescente e cada dia mais fiscalizada. Vírus e outros micro-organismos de interesse em medicina veterinária e humana podem estar sujeitos à sensibilidade frente aos compostos estudados, representando uma ampla linha de pesquisa e potencial à formulação de novos fármacos eficazes.

CONCLUSÕES

Melitina possui efeito antiviral e virucida sobre BoHV-1 e BVDV, além de apresentar alta citotoxicidade em células MDBK. Apamina, atuando individualmente, não demonstrou atividade nas concentrações estudadas e frente aos vírus analisados. O potencial da apamina é demonstrado quando esta é associada à melitina e testadas frente ao BVDV. A associação demonstrou efeito sobre este vírus, tanto na análise antiviral, quanto na virucida.

REFERÊNCIAS

- Aboudy Y., Mendelson E., Shalit I. & Friskin M. 1994. Activity of two synthetic amphiphilic peptides and magainin-2 against herpes simplex virus types 1 and 2. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43 (6):573-582.
- Andersen J.H., Osbakk S.A., Vorland L.H., Traavik T. & Guttenberg T.J. 2001. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Res.* 51(2):141-149.
- Arqyris E.G., Acheampong E., Nunnari G., Mukhtar M., Williams K.J. & Pomerantz, R.J. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. *J. Virol.* 77(22):12140-12151.
- Ashthana N., Yadav S.P. & Ghosh, J.K. 2004. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *J. Biol. Chem.* 279(53):55042-55050.
- Bastian A. & Schäfer, H. 2001. Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul. Pept.* 101(1-3):157-161.
- Belaid, A.; aouni, M.; Khelifa, R.; trabelsi, A.; Jemmali, M.; Hani, K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of Medical Virology*, v. 66, n. 2, p. 229-234, 2002
- Bechinger B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:157-183.
- Bello J., Bello H.R. & Granados E. 1982. Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. *Biochemistry.* 21:461-465.
- Benachir T. & Lafleur, M. 1995. Study of vesicle leakage induced by melittin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1235:452-460.
- Bowdish D.M., Davidson D.J., Speert D.P. & Hancock R.E. 2004. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J. Immunol.* 172(6):3758-3765.
- Bowdish D.M., Davidson D.J., Lau Y.E., Lee K., Scott M.G. & Hancock R.E. 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* 77(4):451-459.

- Brogden K.A., Ackermann M., McCrapp. B. & Tack B.F. 2003. Antimicrobial peptides in animal sand their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22(5):465- 478.
- Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Malque C.M S. & Haddad, J.V. 2003. *Animais Peçonhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp. 550p.
- Chang T.L., Vargas J., Delportillo A. & Klotman M.E. 2005. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J. Clin. Invest.* 115(3):765-773.
- Cragg G.M., Newman D.J. & Snader K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60(1):52-60.
- Cruz-Landim C. & Abdalla F. C. *Glândulas Exócrinas das Abelhas*. 2002. Ribeirão Preto, FUNPEC-Editora. 182p.
- Cuthbertson B.J., Shepard E.F., Chapman R.W. & Gross P.S. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics.* 54(6):442-445.
- Daher K.A., Selsted M.E. & Lehrer R.I. 1986. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 60(3):1068-1074.
- De Clercq, E. 2001. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Pure Appl. Chem.* 73(1):55-66.
- Dempsey, C.E. 1990. The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1031(2):143-161.
- Dias A., Bouvier D., Crepin T., McCarthy A.A., Hart D.J., Baudin F., Cusack S. & Ruigrok R.W.H. 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature.* 458(7240):914-918.
- Engler A.C., Shukla A., Puranam S., Buss H.G., Jreige N. & Hammond P.T. 2011. Effects of side group functionality and molecular weight on the activity of synthetic antimicrobial polypeptides. *Biomacromolecules.* 12(5):1666-1674.
- Faulkner, D.J. 2002. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 19(1):1-49, 2002.
- Fechter P., Mingay L., Sharps J., Chambers A., Fodor E. & Brownlee G.G. 2003. Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J. Biol. Chem.* 278(22):20381-20388.
- Fosgerau K. & Hoffmann T. 2015. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov. Today.* 20(1):122-128.
- Flores, E. F. 2012. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed. da UFSM. 1008p.
- Giansanti F., Massucci M.T., Giardi M.F., Nozza F., Pulsinelli E., Nicolini C., Botti D. & Antonini G. 2005. Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(1):69-73.
- Glatti A., Chandrasenkar I. & Gunsteren W.F. 2006. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in phospholipid bilayer. *Eur. Biophys. J.* 35(3):255-267.
- Gordon-Grossman M., Zimmermann H., Wolf S.G., Shai Y. & Goldfarb D. 2012. Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy. *J. Phys. Chem.* 116(1):179-188.
- Gordon-Grossman M., Gofman Y., Zimmermann H., Frydman V., Shai Y., Ben-Tal N. & Goldfarb D. 2009. A combined pulse EPR and monte-carlo simulation study provides molecular insight on peptide-membrane interactions. *J. Phys. Chem.* 113(38):15128.
- Habermann E. 1972. Bee and wasps venoms. *Science.* 177:314-322.
- Harvey A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drugs discovery? 1999. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(5):196-198.
- Heukelbach J., Alencar C.H., Kelvin A.A., Oliveira W.K. & Cavalcanti L.P.G. Zika virus outbreak in Brazil. 2016. *The J. Infect. Dev. Ctries.* 10(2):116-120.
- Hood L.J., Jallouk A.P., Campbell N., Ratner L. & Wickline S.A. 2013. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antivir. Ther.* 18(1):95-103.
- Hsu C.H., Chen C., Jou M.L., Lee A.Y., Lin Y.C., Yu Y.P., Huang W.T. & Wu S.H. 2005. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Res.* 33(13):4053-4064.
- Horne W.S., Wiethoff C.M., Cui C., Wilcoxen K.M., Amorin M., Ghadiri M.R. & Nemerow G.R. 2005. Antiviral cyclic D,L-alpha-peptides: targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorg. Med. Chem.* 13(17):5445-5143.
- Jenssen H., Andersen J.H., Mantzilas D. & Guttenberg T.J. 2004. A wide range of medium-sized, highly cationic, alpha-helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 64(2):119-126 a
- Jenssen H., Andersen J.H., Uhlin-Hansen L., Gutteberg T.J. & Rekdal Ø. 2004. Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Res.* 61(2):101-109 b
- Jenssen H., Hamill P. & Hancock R.E. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.* 19(3):491-511.
- Kantor I.N. 2016. Dengue, Zika y Chikungunya. *Medicina (Buenos Aires, Artículo especial).* 76:00-00.
- Koumanov K., Momchilova A. & Wolf C. 2003. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type II secretory phospholipase A2. *Cell Biol. Int.* 27(1):871-877.
- Ladokhin A.S. & White S.H. 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1514(2):253-260.
- Lee M.T., Hung W.C., Chen F.Y. & Huang H.W. 2008. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(13):5087-5092.

- Li Q.L., Zhao Z.H., Zhou D.H., Chen Y.Q., Hong W., Cao L.Y., Yang J.Y., Zhang Y., Shi W., Cao Z.J., Wu Y., Yan H. & Li W. 2011. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. *Peptides*. 32(7):1518–1525.
- Lu N.Y., Yang K., Li J.L., Yuan B. & Ma Y.Q. 2013. Vesicle deposition and subsequent membrane-melittin interactions on different substrates: A QCM-D experiment. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.1828(8):1918–1925.
- Ma Q.Q., Shan A.S., Dong N., Gu Y., Sun W.Y., Hu W.N. & Feng X.J. 2011. Cell selectivity and interaction with model membranes of Val/Arg-rich peptides. *J. Pept. Sci.* 17(7):520–526.
- Mardberg K., Trybala E., Tufaro F. & Bergström T. 2002. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. *J. Gen. Virol.* 83(Pt.2):291–300.
- McCann K.B., Lee A., Wan J., Roginski H. & Coventry M.J. 2003. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *J. Appl. Microb.* 95(5):1026–1033.
- Mettenleiter T.C. 2002. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Res.* 82(1-2):3–8.
- Ministério da Saúde - Brasil. 2015. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>>. Acesso em 07 mar. 2016.
- Mollay C., Kreil G. & Berger H. 1976. Action of phospholipases on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Stimulation by melittin. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes*. 426(2):317–324.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Met.* 65:55–63.
- Oren Z. & Shai Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47(6):451–463.
- Pietrantoni A., Ammendolia M.G., Tinari A., Siciliano R., Valenti P. & Superti F. 2006. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 in vitro infection. *Antiviral Res.* 69(2):98–106.
- Raghuraman H. & Chattopadhyay A. 2007. Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci. Rep.* 27(4-5):189–223.
- Robinson W.E., McDougall B., Tra D. & Selsted M.E. 1998. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 63(1):94–100.
- Ruigrok R.W.H., Crepin T., Hart D.J. & Cusack S. 2010. Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20(1):104–113.
- Saini S.S., Peterson J.W. & Chopra A.K. 1997. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238(2):436–442.
- Scott M.G., Davidson D.J., Gold M.R., Bowdish D. & Hancock R.E. 2002. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* 169(7):3883–3891.
- Shieh M.T., Wudunn D., Montgomery R.I., Esko J.D. & Spear P.G. 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Biol.* 116(5):1273–1281.
- Silva Junior A., Kawazoe U., Freitas F.F.T., Gatti M.S.V., Dolder H., Schumacher R.I., Juliano M.A., Silva M.J. & Leite A. 2002. Avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptides elected from phage display libraries. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120(1):53–60.
- Skalickova S., Heger Z., Krejcova L., Pekarik V., Bastl K., Janda J., Kostolansky F., Vareckova E., Zitka O., Adam V. & Kizek R. 2015. Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus. *Viruses*. 7(1):5428–5442.
- Song Y.M., Park Y., Lim S.S., Yang S.T., Woo E.R., Park I.S., Lee J.S., Kim J.I., Hahm K.S., Kim Y. & Shin S.Y. 2005. Cell selectivity and mechanism of action of antimicrobial model peptides containing peptoid residues. *Biochemistry*. 44(36):12094–12106.
- Spillmann D. 2001. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie*. 83(8): 811–817.
- Strohl W.R. 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov. Today*. 5(2):39–41.
- Tamamura H., Murakami T., Masuda M., Otaka A., Takada W., Ibuka T., Nakashima H., Waki M., Matsumoto A. & Yamamoto N. 1994. Structure-activity relationships of an anti-HIV peptide, T22. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205(3):1729–1735.
- Tamamura H., Ishihara T., Otaka A., Murakami T., Ibuka T., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N. & Fujii, N. 1996. Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr5, 12, Lys7]-polyphemusin II), with gp120 and CD4 by surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta*. 1298(1):37–44.
- Wachinger M., Kleinschmidt A., Winder D., Von Pechmann N., Ludvigsen A., Neumann M., Holle R., Salmons B., Erfle V. & Brack-Werner R. 1998. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 79(Pt.4):731–740.
- Wudunn D. & Spear, P.G. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63(1):52–58.

- Yasin B., Pang M., Turner J.S., Cho Y., Dinh N.N., Waring A.J., Lehrer R.I. & Wagar E.A. 2000. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *Eur. J. Clin. Microb. Infec. Dis.* 19(3):187-194.
- Yasin B., Wang W., Pang M., Cheshenko N., Hong T., Waring A.J., Herold B.C., Wagar E.A. & Lehrer R.I. 2004. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J. Virol.* 78(1):5147-5156.
- Yuan P.W., Bartlam M., Lou Z.Y., Chen S.D., Zhou J., He X.J., Lv Z.Y., Ge R.W., Li X.M., Deng T., Fodor E.; Rao Z. & Liu Y. 2009. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(n) reveals an endonuclease active site. *Nature.* 458(7240):909-913.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, v. 415, n.6870, p. 389-395, 2002.
- Zhang N.Z., Qi J.X., Feng S.J., Gao F., Liu J., Pan X.C., Chen R., Li Q.R., Chen Z.S., Li X.Y., Xia C. & Gao G.F. 2011. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-1*0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic t lymphocyte epitope peptides. *J. Virol.* 85(22):11709-11724.

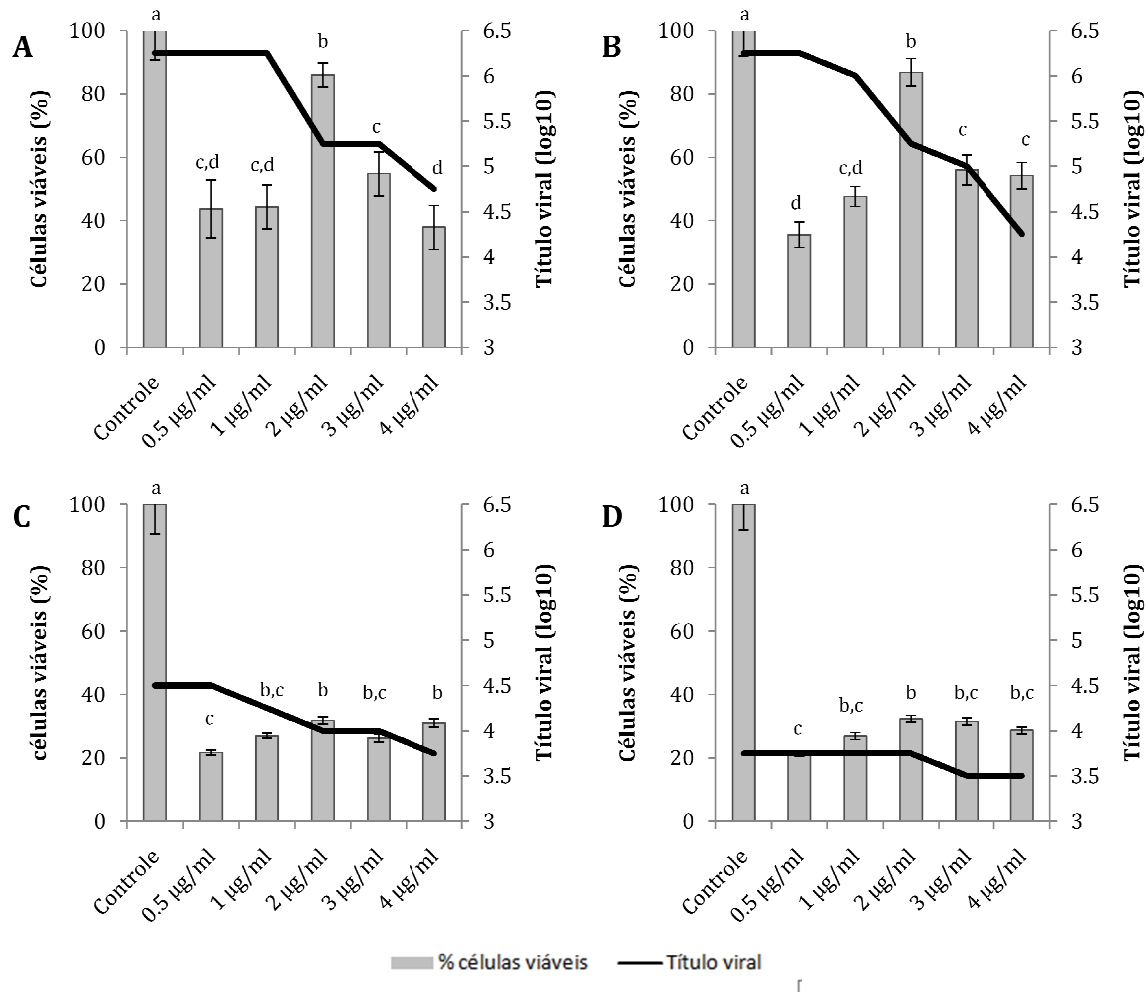


Fig. 1. Atividade antiviral da melitina após 72 horas. (A) Tratamento pré-infecção frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1); (B) tratamento pós-infecção frente ao BoHV-1; (C) tratamento pré-infecção frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV); (D) tratamento pós-infecção frente ao BVDV. Letras diferente entre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

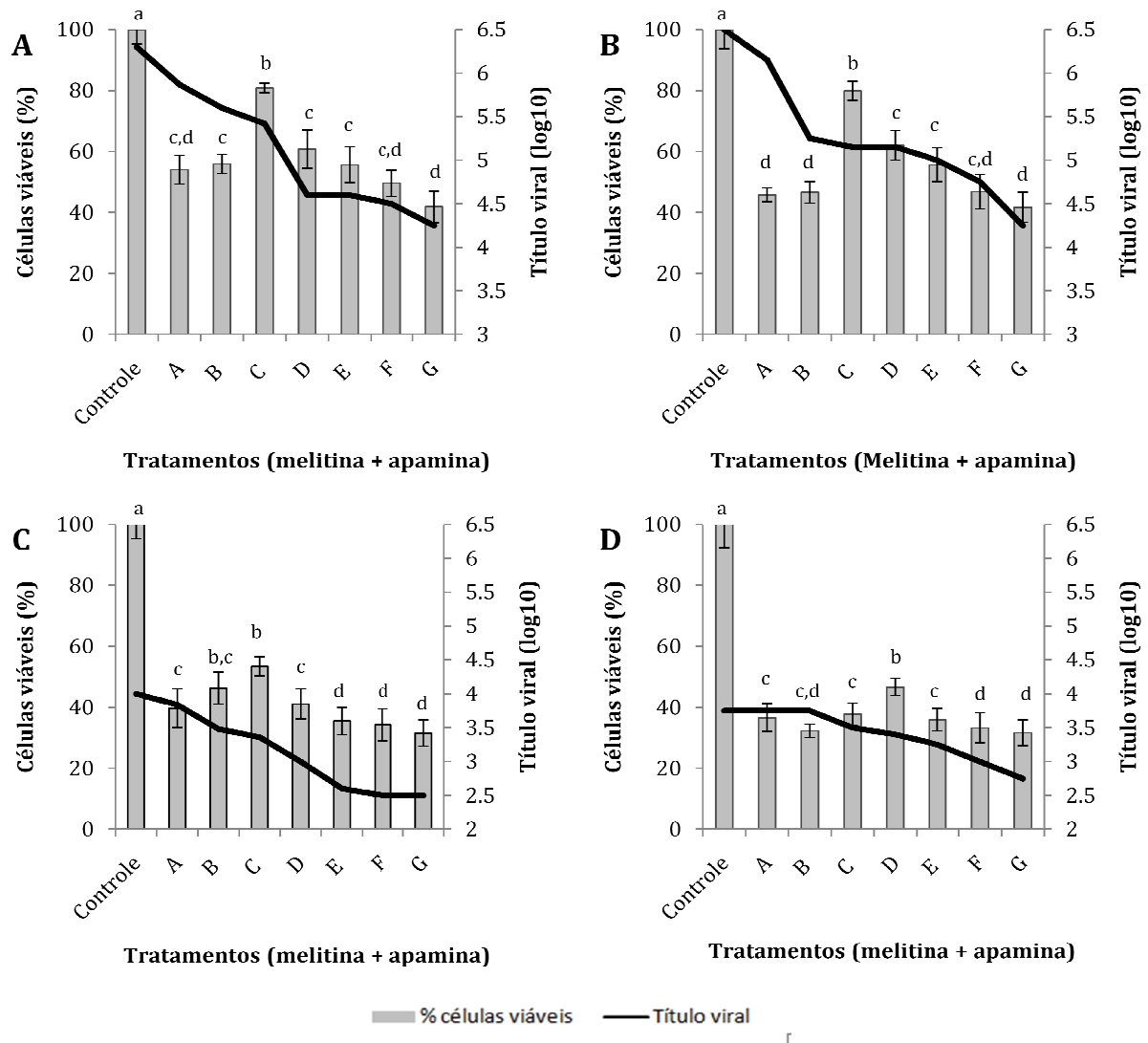


Fig. 2. Atividade antiviral da associação entre melitina e apamina após 72 horas. (A) Tratamento pré-infecção frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1); (B) tratamento pós-infecção frente ao BoHV-1; (C) tratamento pré-infecção frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV); (D) tratamento pós-infecção frente ao BVDV. Tratamentos: A (melitina: 1 µg/ml, apamina: 0,04 µg/ml), B (melitina: 1,5 µg/ml, apamina: 0,06 µg/ml), C (melitina: 2 µg/ml, apamina: 0,08 µg/ml), D (melitina: 2,5 µg/ml, apamina: 0,1 µg/ml), E (melitina: 3 µg/ml, apamina: 0,12 µg/ml), F (melitina: 3,5 µg/ml, apamina: 0,14 µg/ml) e G (melitina: 4 µg/ml, apamina: 0,16 µg/ml). Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

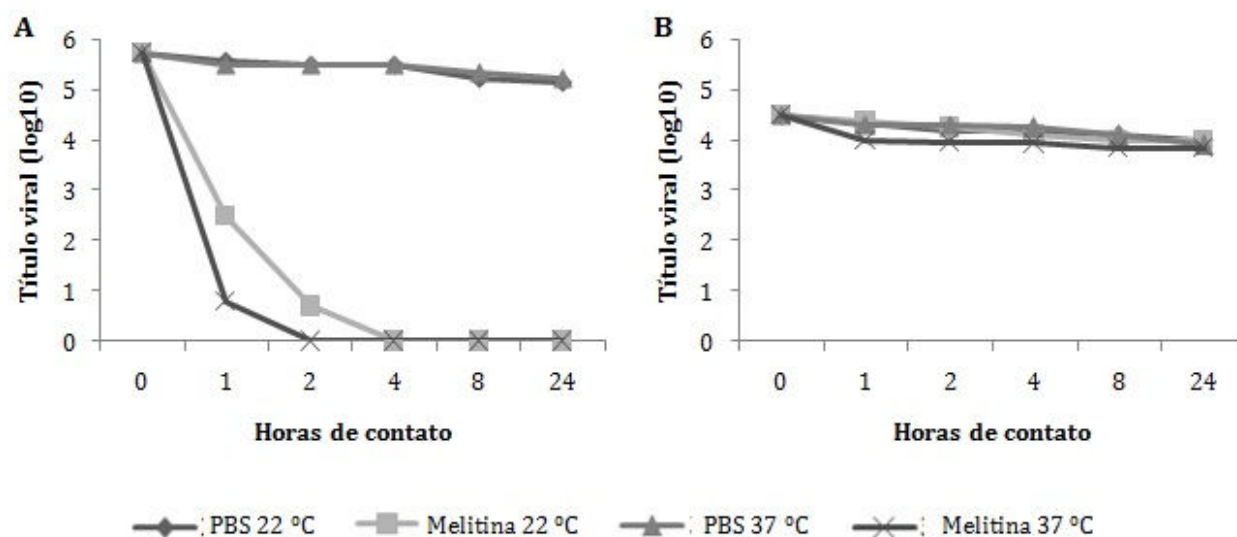


Fig. 3. Atividade virucida de melitina (25 µg/mL) após 24 horas de contato com herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina. (A) Título de BoHV-1; (B) Título de BVDV.(♦) contato com PBS a 22°C; (▲) contato com PBS a 37°C; (■) contato com melitina a 22°C; (×) contato com melitina a 37°C

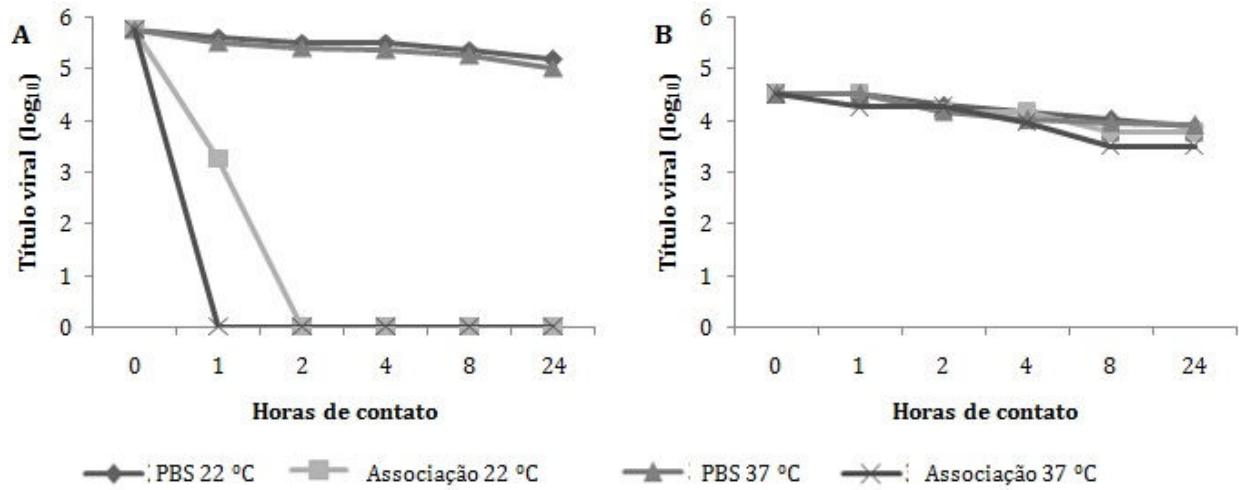


Fig. 4. Atividade virucida da associação entre melitina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e apamina (100 ng/mL) após 24 horas de contato com herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina. (A) Título de BoHV-1; (B) Título de BVDV. (◆) contato com PBS a 22°C; (▲) contato com PBS a 37°C; (■) contato com associação a 22°C; (×) contato com associação a 37°C

4.4 Artigo 4

Atividade antibacteriana e antibiofilme da melitina

Tony Picoli, Cristina Mendes Peter, João Luiz Zani, Gilberto D'Ávila Vargas, Silvia de Oliveira Hübner, Geferson Fischer

Artigo formatado segundo as normas da UFPel

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DA MELITINA

Tony Picoli^{8*}, Cristina Mendes Peter⁹, João Luiz Zani¹⁰, Gilberto D'Ávila Vargas³,
Silvia de Oliveira Hübner³, Geferson Fischer³

RESUMO

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* destacam-se em medicina veterinária e humana por seu papel oportunista nas infecções e por seus mecanismos de patogenicidade, incluindo a formação de biofilmes. Objetivamos avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme da melitina sobre tais bactérias. Foram utilizadas 4 cepas de cada espécie, isoladas de leite bovino e ainda as cepas *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* ATCC 8739 e *P. aeruginosa* ATCC 15442. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram encontradas a partir da técnica de microdiluição em caldo. Os biofilmes foram formados em placas de 96 cavidades e melitina foi adicionada sobre estas colônias em diferentes concentrações e períodos. Ainda, bactérias previamente expostas à melitina foram avaliadas quanto à inibição da produção do biofilme. A CIM e CBM foram, respectivamente em µg/mL: *S. aureus* (6-7 e 32-64), *E. coli* (40-42,5 e 64-128) e *P. aeruginosa* (65-70 e 64-128). Biofilmes de *S. aureus* mostraram-se mais sensíveis à ação da melitina, já que ao ser expostos a uma concentração 10 vezes menor que a CIM durante quatro horas, foram totalmente destruídos. Nas bactérias Gram negativas estudadas, o biofilme pré-formado foi totalmente destruído apenas quando exposto por 4 horas sob a CIM. Com relação à inibição da produção dos biofilmes, *S. aureus* novamente foi mais sensível, produzindo apenas 37,2% do biofilme formado pelo controle (sem exposição prévia à melitina) quando exposto à CIM e com uma concentração cem vezes menor que a CIM, produziu 75,2%. *E. coli* foi a bactéria mais resistente e produziu 56,3% do biofilme, mesmo sendo exposta previamente à CIM de melitina. Nota-se que melitina apresenta efeitos desejáveis no combate aos microorganismos estudados tanto em sua eliminação, destruição de biofilmes e na inibição da formação destes, podendo ser utilizada em estudos futuros visando novas estratégias de combate às infecções causadas por estes patógenos.

Palavras-chave: peptídeo, antimicrobiano, biofilme

⁸ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Brasil. *Autor para correspondência: picolivet@gmail.com

⁹ Médica Veterinária, Residente em Saúde Coletiva, Hospital Escola, Universidade Federal de Pelotas, Brasil

¹⁰ Professor Doutor do Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, Brasil

ABSTRACT

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* stand out in veterinary and human medicine for his role in opportunistic infections and their pathogenic mechanisms, including the formation of biofilms. We investigate the antibacterial activity of melittin and antibiofilm of such bacteria. Four strains were used for each species isolated from bovine milk and also the strains *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* ATCC 8739 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by microbroth dilution technique. The biofilms were formed in 96-well plates and melittin on these colonies was added at different concentrations and times. Bacteria previously exposed to melittin were evaluated for inhibition of biofilm production. The MIC and MBC were respectively in µg/mL: *S. aureus* (6-7 and 32-64), *E. coli* (40 to 42.5 and 64-128) and *P. aeruginosa* (65-70 and 64- 128). *S. aureus* biofilms were more sensitive to the action of melittin, since upon exposure to a concentration 10 times lower than the MIC for four hours, was completely destroyed. In Gram negative bacteria studied, the pre-formed biofilm was destroyed only when exposed for 4 hours under the CIM. With respect to inhibition of biofilm production, again *S. aureus* was more sensitive, producing only 37.2% of the biofilm formed by the control (without exposure to melittin) when exposed to the MIC and at a concentration hundred times smaller than CIM produced 75.2%. *E. coli* was the most resistant bacteria and produced 56.3% of the biofilm, even if previously exposed to melittin MIC. Melittin presents desirable effects in combating microorganismos studied both at your disposal, biofilm destruction and inhibition of the formation, and may be used in future studies of new strategies to combat infections caused by these pathogens.

Keywords: peptide, antimicrobial, biofilm

INTRODUÇÃO

O uso desenfreado e, muitas vezes inadequado de antibióticos sintéticos na terapia antibacteriana propiciou o desenvolvimento de resistência dos microorganismos frente aos princípios ativos mais utilizados. A ineficácia dos antibióticos tradicionais têm levado à incessante busca por tratamentos alternativos das infecções e, os produtos de origem natural oferecem uma diversidade de princípios ativos e mecanismos de ação, muitos ainda desconhecidos, estimulando a sua pesquisa em todo planeta.

Os peptídeos naturais antimicrobianos são essenciais à vida de diversos organismos, microscópicos ou não, e já foram identificados mais de 750 compostos em bactérias, fungos, vírus, plantas, insetos, moluscos, aracnídeos, anfíbios, peixes, aves e mamíferos (CUTHBERTSON et al., 2002; SILVA JUNIOR et al., 2002; ZASLOFF, 2002; BROGDEN et al., 2003). Os estudos, tendo como base esses

peptídeos, já revelaram atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiparasitária (BAHAR; REN, 2013).

A melitina é um conhecido peptídeo tóxico, solúvel em água, presente no veneno de abelhas melíferas, compreendendo aproximadamente 50% do seu peso seco (HABBERMAN, 1972; CRUZ-LANDIM et al., 2002). Com apenas 26 aminoácidos em sua conformação, é a toxina mais ativa do veneno. Quando armazenada na vesícula de veneno, arranja-se de forma tetramérica diminuindo sua toxicidade (CARDOSO et al., 2003). Entretanto, quando o veneno é liberado, dissocia-se e, individualmente, sua forma monomérica passa a ter alta toxicidade e, quando associada à fosfolipase A2, também presente no veneno, tem sua ação amplificada e ainda modula a ação das fosfolipases, aumentando suas ações catalíticas (CARDOSO et al., 2003; KOUMANOV et al., 2003). Possui rápida ação citolítica, desestabilizando membranas celulares e liberando conteúdo citoplasmático de diversos tipos celulares (DEMPSEY, 1990). Esta capacidade lítica não se restringe às células animais, uma vez que apresenta capacidade antibacteriana e antifúngica conhecidas (ASHTHANA et al., 2004).

Em medicina veterinária, assim como na medicina humana, algumas bactérias se destacam devido à sua patogenicidade, epidemiologia, diversidade de sinais clínicos e problemas relacionados à saúde pública. É o caso de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A primeira trata-se de bactéria esférica Gram positiva com uma diversidade de fatores de virulência (BERGDOLL, 1990). É uma das principais causas de internações hospitalares por causar uma grande variedade de sintomas, podendo atingir tecidos moles, causar infecções respiratórias, circulatórias, osteo-articulares além do grande potencial de causar doenças mediadas por toxinas como as doenças transmitidas por alimentos (TONG et al., 2015). Lindsay e Holden (2004) afirmam ainda que pacientes hospitalizados estão particularmente expostos à novas infecções por *S. aureus* devido ao sistema imune comprometido e, dessa forma, esse micro-organismo torna-se o principal causador de infecções hospitalares. *E. coli* e *P. aeruginosa* são micro-organismos Gram negativos também relacionados com importantes doenças em humanos e animais como gastro-enterites, infecções urinárias, peritonites e meningites (CHAPAVALL et al., 2010).

Todas elas, no entanto, apresentam um fator de virulência em comum: a produção de biofilmes, definidos como colônias bacterianas aderidas por meio de filamentos protéicos a uma superfície e envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos (COSTERTON et al., 1999). Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta, debaixo das quais os micro-organismos continuam a se multiplicar. Dessa forma, os micro-organismos se tornam mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos (MARQUES, 2005). Os biofilmes bacterianos representam perigo à indústria de alimentos, uma vez que representam uma contaminação constante do produto, já que se formam em locais por onde o produto entra em contato, como tubulações de inox, utensílios, mesas, entre outros (MARQUES et al., 2007). Podem ainda ser formados no organismo, durante uma infecção, o que confere às bactérias maior resistência aos fármacos disponíveis e ao sistema imune do hospedeiro (KOSTAKIOTI et al., 2013; HAUSSLER; FUQUA, 2013)

Este estudo objetivou avaliar as atividades antibacteriana e anti-biofilmes *in vitro* do peptídeo melitina sobre isolados de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismos e soluções

Foram testadas 12 cepas bacterianas isoladas de leite bovino proveniente de tanques resfriadores em propriedades leiteiras: 4 isolados de *S. aureus*, 4 isolados de *E. coli* e 4 isolados de *P. aeruginosa*. Incluiu-se também as cepas *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* ATCC 8739 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 que foram usadas como cepas controle em todos os experimentos.

As cepas bacterianas, estocadas a -10 °C, foram descongeladas e semeadas em Agar Columbia acrescido de 5% de sangue ovino desfibrinado. As placas foram incubadas em aerobiose a 37° C por 24 horas, quando as colônias foram retiradas e suspensas em caldo Müller-Hinton até concentração aproximada de 10⁵⁻⁶ Unidades formadoras de colônia (UFC)/ mL.

Melitina foi adquirida comercialmente de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), dissolvida em tampão fosfato pH 7,2 estéril (PBS) e mantida congelada a -80° C até o momento do uso.

Ensaio da atividade antibacteriana

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. Para tanto, as substâncias sofreram diluições seriadas na base 2 em placas de poliestireno de 96 cavidades (KASVI®) e após, os inóculos bacteriano foram adicionados. As microplacas permaneceram em estufa 37° C por 24 horas.

O valor da CIM foi determinado visualmente por comparação do crescimento bacteriano com controle positivo. Diluições de melitina entre a menor concentração que promoveu inibição do crescimento bacteriano e a concentração imediatamente maior, foram preparadas em escala aritmética para a obtenção de uma CIM mais aproximada. A CIM ficou entre a menor concentração capaz de promover inibição do crescimento bacteriano e a menor concentração que não promoveu inibição. Para obtenção da concentração inibitória para 50% das células bacterianas (CI_{50}), foi realizada regressão linear simples. Para obtenção dos valores da Concentração Bactericida Mínima (CBM), alíquotas de 10 µL de todos os poços sem crescimento bacteriano foram semeadas para placas de Petri contendo Agar BHI (Prolab®/São Paulo) e incubadas a 37°C por 48 horas. A CBM refere-se à menor concentração capaz de provocar eliminação bacteriana. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Produção de biofilmes

Em placas com 96 cavidades (KASVI®), foram adicionados 200 µL de inóculos bacterianos contendo 10^{5-6} UFC/mL em caldo Müller-Hinton. As placas permaneceram em estufa bacteriológica durante 48 horas a 37° C para crescimento e formação de biofilme. A quantificação de biofilmes foi obtida através de metodologia descrita por Tang et al. (2011), quando os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e as cavidades submetidos a 2 lavagens com 200 µL de PBS. Então 200 µL de solução MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) foi adicionada às cavidades e, após nova incubação em microaerofilia por 4 horas na ausência de luz, o sobrenadante foi novamente aspirado e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado às cavidades para solubilização dos sais de formazan gerados. Após leve agitação das placas por 10 minutos para homogeneização da cor, as absorbâncias foram mensuradas em espectrofotometria sob comprimento de onda de 496 nm. Biofilmes formados por

bactérias que não sofreram qualquer tipo de tratamento com melitina foram utilizados como controle, para comparação com as médias dos tratamentos. Os testes foram realizados em sextuplicata.

Ensaio de destruição de biofilmes

O ensaio foi realizado após a formação do biofilmes de maneira idêntica à já descrita. Após 24 horas de incubação as cavidades foram lavadas 3 vezes com PBS estéril para posterior adição de 200µL de melitina em concentração igual à CIM previamente estabelecida (1 x MIC), dez vezes menor (1/10 x MIC) e cem vezes menor (1/100 x MIC). As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora, 2 horas e 4 horas. Seis cavidades foram usados para cada tratamento frente a cada uma das bactérias (sextuplicata). Os controles positivos foram cepas das bactérias testadas cultivadas em microplaca sem nenhum tipo de tratamento. Após a incubação, as cavidades foram novamente lavados com PBS estéril e o ensaio MTT e leitura das absorbâncias foram realizados como já descrito.

Ensaio da Inibição da formação de biofilmes

As cepas bacterianas estudadas foram incubadas em tubos contendo caldo TSB a 37°C por 24 horas com melitina em concentrações 1 x MIC, 1/10 x MIC e 1/100 x MIC. Então 200µL dessas suspensões, em sextuplicata, foram transferidos às microplacas as quais foram incubadas em estufa à 37°C por 24 horas. Os controles positivos foram as bactérias incubadas em caldo TSB sem nenhum tipo de tratamento. Após a incubação, as cavidades foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e o ensaio da redução do MTT e leitura das absorbâncias foram novamente aplicados conforme já descrito.

Análise estatística

Para obtenção das CI_{50} , os resultados dos testes que revelaram as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram submetidos à análise de regressão linear simples. Os valores das absorbâncias obtidos após os ensaios de destruição ou inibição da formação de biofilmes foram submetidos à análise de variância com comparação entre médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas através do software estatístico BioEstat versão 5.3[®] e o valor de $P < 0,05$ foi adotado para indicar diferença estatística entre as médias.

RESULTADOS

As primeiras avaliações realizadas dizem respeito à obtenção da CIM e CBM de melitina para as espécies bacterianas estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória para 50% das células bacterianas (IC₅₀) da melitina

Espécie bacteriana	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	6 - 7	32 - 64	5.25
<i>E. coli</i>	40 - 42.5	64 - 128	33.8
<i>P. aeruginosa</i>	65 - 70	64 - 128	63.75

CI₅₀ calculada através de regressão linear simples

Observa-se a maior sensibilidade de *S. aureus* à melitina quando comparado às demais estirpes bacterianas avaliadas. A CIM de *S. aureus* demonstrou ser 6 vezes mais baixa que a CIM de *E. coli* e 10 vezes menor que a CIM de *P. aeruginosa*. Os demais parâmetros avaliados (CBM, CI₅₀ e os testes quanto à atividade de melitina sobre biofilmes) seguem o mesmo padrão, com *S. aureus* sendo mais sensível ao peptídeo (Tabela 1).

No que diz respeito à produção de biofilmes, os controles bacterianos produziram as seguintes densidades ópticas (DO) a 496 nm: *S. aureus* (0,436 ± 0,087, n=6), *E. coli* (0,843 ± 0,166, n=6) e *P. aeruginosa* (1,128 ± 0,196, n=6). As avaliações do efeito de melitina sobre esses biofilmes já formados demonstram resultados que sugerem sua destruição (Figura 1).

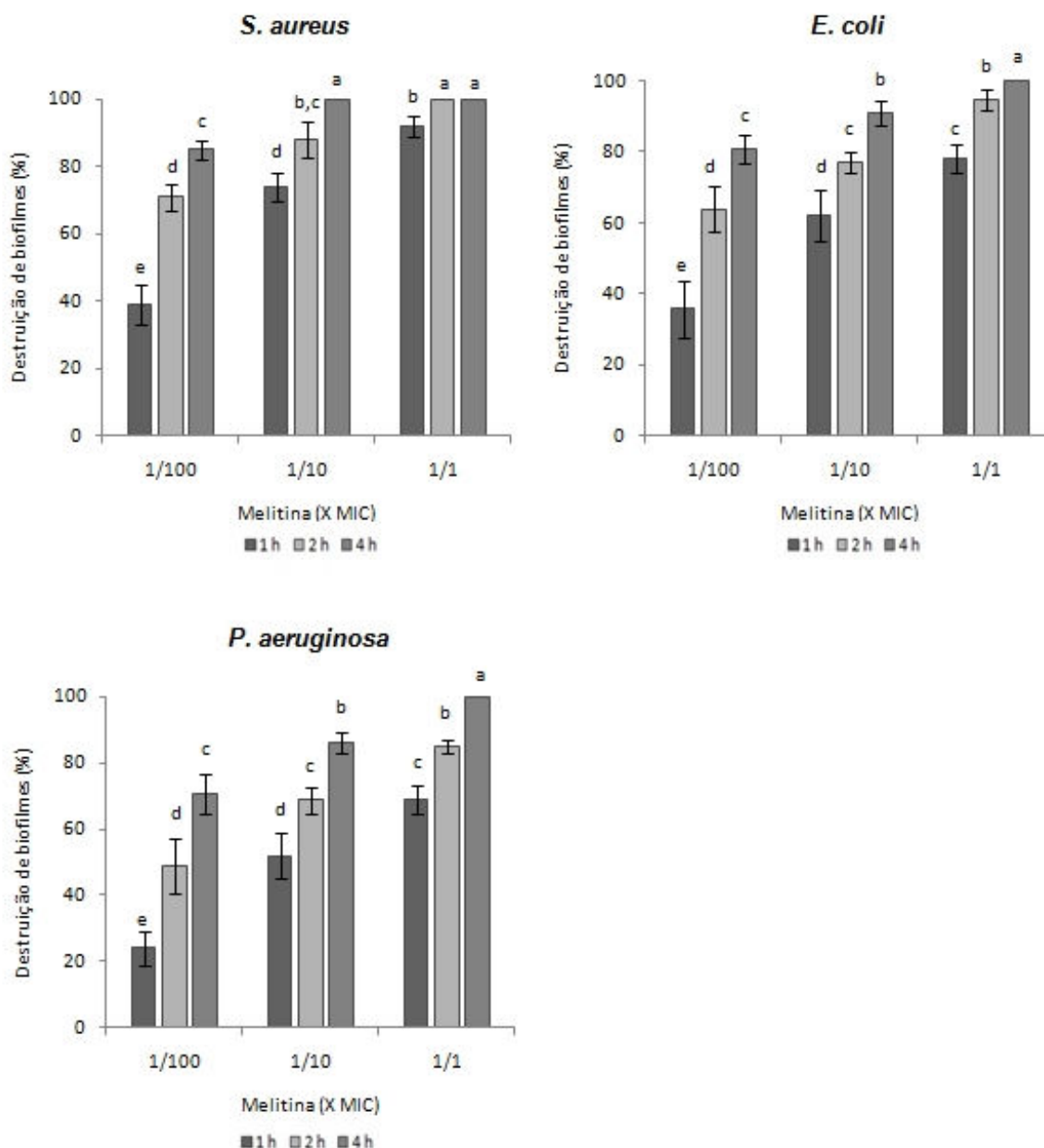


Figura 1. Ação da melitina sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em suas concentrações inibitórias mínimas (MIC), dez vezes menor (1/10 x MIC) e cem vezes menor (1/100 x MIC), após 1, 2 e 4 horas de exposição

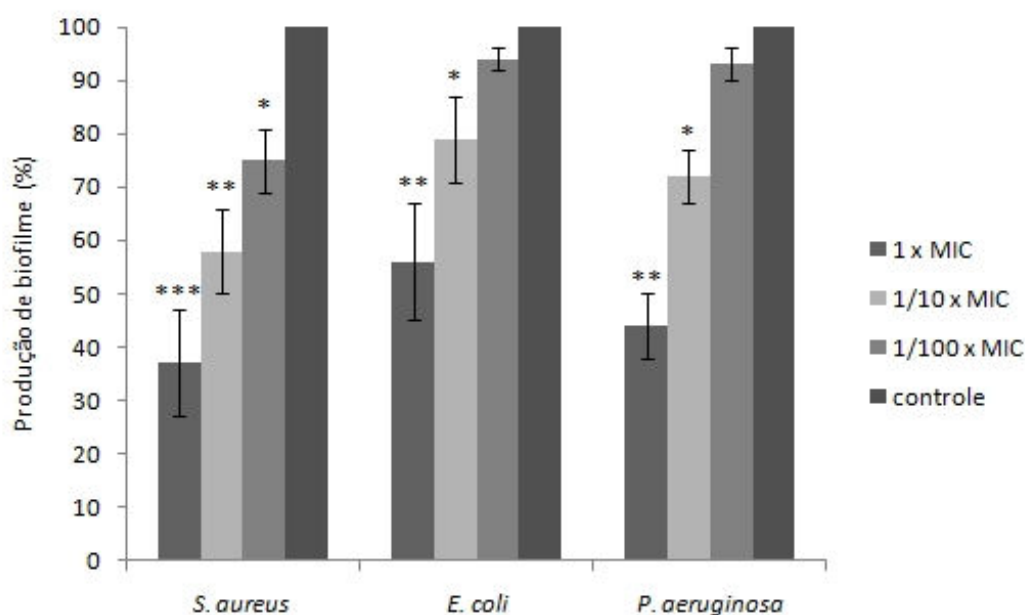
Utilizando a CIM de melitina contra biofilmes de *S. aureus*, em apenas uma hora de exposição, 92,3% ± 3,02% do biofilme pré-formado foi destruído. Já em concentrações mais baixas (1/10 x CIM e 1/100 x CIM) com o mesmo período de exposição, a destruição de biofilmes foi, respectivamente de 74,2% ± 4,21% e 39,5% ± 6,04%. Utilizando concentração dez vezes menor que a CIM de melitina, durante 2 horas de exposição, a destruição de biofilmes foi de 88,1% ± 4,08% e não diferiu do

tratamento com concentração cem vezes menor com 4 horas de exposição ($85,2\% \pm 3,19\%$) nem do tratamento por uma hora com a CIM ($92,3\% \pm 3,02\%$). Concentração 1/10 x CIM por 4 horas e 1 x CIM por 2 e 4 horas atingiram 100% de destruição dos biofilmes de *S. aureus*.

As bactérias Gram negativas estudadas, *E. coli* e *P. aeruginosa*, apresentaram maior resistência à ação de melitina (CIM, CBM e IC₅₀ maiores) quando comparadas à espécie Gram positiva *S. aureus*. Da mesma maneira, os biofilmes das Gram negativas mostraram-se mais resistentes, sendo totalmente eliminados apenas após 4 horas de exposição com a maior concentração de melitina. Já os biofilmes que sofreram exposição por 2 horas com 1 x CIM e por 4 horas com 1/10 x CIM de melitina não diferiram em nenhuma das espécies Gram negativas, assim como não houve diferença entre às exposições por 1 hora com 1 x CIM, 2 horas com 1/10 x CIM e 1/100 x CIM. Porém, em todas as concentrações de melitina utilizadas, houve diferença estatística entre os todos tempos de exposição dentro de um mesmo tratamento, o que indica uma ação tempo e dose dependente.

Os resultados da inibição da produção de biofilmes, quando as bactérias foram tratadas com concentrações não bactericidas de melitina, estão demonstrado na Figura 2 e são expressos em produção de biofilme comparados ao controle de bactérias não tratadas.

Nota-se a baixa produção de biofilmes de todas as espécies avaliadas quando foram submetidas a 1 x CIM de melitina por 24 horas: *S. aureus* ($37,2\% \pm 9,8\%$, n=6), *E. coli* ($56,3\% \pm 11,1\%$, n=6) e *P. aeruginosa* ($43,9\% \pm 6,1\%$, n=6). Observa-se uma ação dose-dependente de melitina também na inibição da produção dos biofilmes, porém *E. coli* mostrou-se mais resistente à essa ação, pois o tratamento prévio com todas as concentrações de melitina, essa espécie bacteriana demonstrou a maior produção de biofilmes entre as 3 espécies estudadas. A bactéria Gram positiva *S. aureus*, mais uma vez mostrou-se a mais sensível à ação do peptídeo, uma vez que o tratamento com a menor concentração de melitina (1/100 x CIM) foi capaz de produzir apenas $75,2\% \pm 5,8\%$ (n=6) de biofilmes. As bactérias Gram negativas, no tratamento com 1/100 x CIM não diferiram do controle, indicando que essa concentração de melitina não inibiu a produção dos biofilmes de *E. coli* e *P. aeruginosa*.



* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ - diferença estatística do controle (bactérias não submetidas a tratamento prévio) calculada por análise de variância e comparação entre médias pelo teste de Tukey

Figura 2. Produção de biofilmes por bactérias previamente submetidas a três diferentes concentrações da melitina a partir da concentração inibitória mínima (MIC) durante 24 horas

DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado a atividade antibacteriana de melitina (KIM et al., 2013; PARK et al., 2014; AL-ANI et al., 2015), porém assim como em nosso estudo, Han et al. (2009) determinaram uma maior sensibilidade de bactéria Gram positivas à melitina em relação às Gram negativas. Esta diferença pode ser explicada pela diferença nas paredes celulares e estrutura das membranas desses micro-organismos. Melitina pode penetrar o envelope de peptidoglicanos e alcançar a membrana celular dos Gram-positivos com mais facilidade do que em Gram-negativos que tem sua membrana protegida ainda por uma camada de lipopolissacarídeos (DATHE; WIEPRCHT, 1999; NEVALAINEN et al., 2008).

A ação de melitina sobre as membranas lipídicas causa permeabilização, formação de poros artificiais, rompimento e lise (LADOKHIN; WHITE, 2001; RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2007; LEE et al., 2008; ZHANG et al., 2011). A interação de melitina com as membranas fosfolipídicas foi primeiramente descrita

por Terwilliger et al. (1982b) e comprovada por diversos autores com os mais variados experimentos (WU et al., 2011; LEE et al., 2013). Os mecanismos de atuação propostos sobre as membranas foram denominados "modelo barril" e "modelo carpete". O primeiro, através de agregados de melitina formados perpendicularmente à superfície da membrana, forma rupturas em formato toroidal (em forma de barril). O "modelo carpete", cursa com uma grande quantidade do peptídeo que se distribui paralelamente na superfície da membrana e interage eletrostaticamente com as cabeças dos lipídeos, desorganizando a bicamada lipídica de modo semelhante a um detergente e, dessa forma, causa permeabilização (GORDON-GROSSMAN et al., 2012; GORDON-GROSSMAN et al., 2009; BECHINGER, 1999).

Segundo Yeaman e Yount (2003), os peptídeos antimicrobianos compõem ainda uma classe de substâncias que atuam como componentes anti-resistência dos antibióticos tradicionais, quando atuam em associação. Eles são capazes de interagir com membranas bacterianas criando canais de íons que levam à permeabilização da membrana citoplasmática e à morte da célula bacteriana. Podem ainda favorecer a entrada de outras substâncias, como antibióticos, ao interior da célula (HANCOCK; SAHL, 2006).

Al-Ani et al. (2015) ao estudarem atividade antibacteriana de melitina encontraram CIM de 10 µg/mL e CBM de 30 µg/mL para *S. aureus* ATCC 25923 e para *S. aureus* metilicina resistente ATCC 106804 e ATCC 106091 CIM de 30 µg/mL e CBM de 50 µg/mL. Ainda encontrou CIM de 30 µg/mL e CBM de 60 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* O157:H7 ATCC 35150. Já para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC KI 206466 a CIM e a CBM foi de 100 µg/mL.

Devido à resistência que bactérias associadas à produção de biofilmes apresentam a diversos químicos, as principais estratégias para o combate à esses microorganismos estão associadas à inibição da formação dos biofilmes tendo como alvos principais a redução de células bacterianas das superfícies após o uso, prevenção da adesão bacteriana à essas superfícies e remoção dos biofilmes maduros (HAUSLER; FUQUA, 2013).

Nota-se, no presente estudo, a ação de melitina na destruição de biofilmes formados por todas as espécies bacterianas estudadas, porém a sensibilidade dos biofilmes de *S. aureus* chama a atenção, visto ser essa uma bactéria relevante na formação de biofilmes em diversas superfícies incluindo as linhas produtivas de

alimentos e dos efeitos deletérios que causa à saúde por ser uma fonte de toxinas (MARQUES et al., 2007).

A destruição de biofilmes formados por *P. aeruginosa* por ação da melitina é retratada por Dosler e Karaaslan (2014) quando utilizaram concentração dez vezes menor que a MIC de melitina frente a esta bactéria. Com uma hora de contato houve destruição de mais de 50% do biofilme e após 4 horas, mais de 80% havia sido destruído, o que corrobora com nossos resultados. Esses autores ainda avaliaram a produção de biofilmes por *P. aeruginosa* após prévia exposição à melitina e encontraram formação de apenas 45% do biofilme formado pelo controle (sem exposição) (1 x MIC), 70% (1/10 x MIC) e 92% (1/100 x MIC).

Dosler et al. (2016) também encontraram dados semelhantes frente à *P. aeruginosa* utilizando a mesma metodologia frente a biofilmes formados por *E. coli*: observaram 70% de destruição após 4 horas de contato da melitina (1/10 x MIC). Para *E. coli*, esses autores ainda testaram a inibição da formação dos biofilmes por cepas que sofreram prévia exposição à melitina e encontraram inibição de 43% (1 x MIC), 38% (1/10 x MIC) e 28% (1/100 x MIC).

Células bacterianas que crescem em biofilmes são fisiologicamente distintas às células que não têm ativados os genes ligados a sua produção. O microorganismo sofre mudanças fenotípicas em seu comportamento e um grande grupo de genes são regulados de maneira distinta. Dessa forma toda a colônia torna-se refratária à terapia tradicional com antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando o quadro clínico mais grave (KOSTAKIOTI et al., 2013).

Para contornar a resistência microbiana quando associada ao biofilme, há a possibilidade de utilizar combinações de agentes antimicrobianos, incluindo os peptídeos antimicrobianos naturais, que podem atuar sinergicamente beneficiando os tratamentos em velocidade de cura e prevenindo e/ou retardando a formação do biofilme (DOSLER et al., 2016). O desenvolvimento de terapias anti-biofilme têm foco na interferência no sistema *quorum sensing*, na inibição da adesão, dispersando assim as bactérias para que os antimicrobianos possam atuar sobre uma única célula bacteriana desprotegida do sistema biofilme (CHEN; WEN, 2011; MATARACI; DOSLER, 2012).

Nesse sentido, em nosso estudo e, corroborando com a literatura existente, a melitina se apresentou eficaz tanto na destruição de biofilmes pré-formados como no

combate à formação deste, demonstrando ser um peptídeo com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou sanitizantes com este objetivo.

CONCLUSÕES

Melitina apresenta efeito antibacteriano contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Apresenta ainda capacidade para destruir biofilmes formados por estas bactérias, assim como para inibir a produção em bactérias previamente expostas. Assim sendo, melitina demonstra potencial para futuros estudos em busca do desenvolvimento de novos fármacos e/ou sanitizantes objetivando o estabelecimento de novas estratégias no combate à infecções causadas por estas bactérias.

REFERÊNCIAS

- AL-ANI, I.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. **Phytomedicine**, v. 22, n. 2, p. 245-255, 2015.
- ASHTHANA, N.; YADAV, S.P.; GHOSH, J.K. Dissection of antibacterial and toxic activity of mellitin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n.53, p. 55042-55050, 2004.
- BAHAR, A.A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v.6, p.1543-1575, 2013
- BECHINGER, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p.157-183, 1999.
- BERGDOLL, M.S. **Staphylococcal food poisoning**. In: CLIVER, D.O. (Ed.). Foodborne 449 diseases. London: Academic, p.87-106, 1990.
- BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.; MCCRAY, B.; TACK, B.F. Antimicrobial peptides in animal sand their role in host defences. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 5, p. 465- 478, 2003.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALQUE, C.M S.; HADDAD, J.V. **Animais Peconhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp.(2003).

CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C.S.; SOUZA, F.G.C.; ALVES, F.S.F.; FROTA, I.A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.1, p. 49-56, 2010

CHEN, L.; WEN, Y.M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Sciences**, v.3, n.2, p. 66-73, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v.284, p. 1318-1322, 1999.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto, FUNPEC-Editora.(2002).

CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS P.S. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v.54, n.6, p.442-445, 2002

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta) - Biomembranes.**, v. 1462, n.1-2, p. 71-87, 1999.

DEMPSEY, C.E. The actions of melittin on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1031, n.2, p.143-161, 1990.

DOSLER, S.; KARAASLAN, E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 62, p. 32-37, 2014

DOSLER, S.; KARAASLAN, E.; ALEV GERCEKER, A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. **Journal of Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 95-103, 2016.

GORDON-GROSSMAN, M.; ZIMMERMANN, H.; WOLF, S.G.; SHAI, Y.; GOLDFARB, D. Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.116, n. 1, p.179–188, 2012.

GORDON-GROSSMAN, M.; GOFMAN, Y.; ZIMMERMANN, H.; FRYDMAN, V.; SHAI, Y.; BEN-TAL, N.; GOLDFARB, D. A combined pulse EPR and monte carlo simulation study provides molecular insight on peptide-membrane interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.113, p.15128, 2009.

HABERMANN, E. Bee and wasps venoms. **Science**, v. 177, p.314-322, 1972

HAN, S.; YEO, J.; BAEK, H.; LIN, S.M.; MEYER, S.; MOLAN, P. Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom against *Escherichia coli* and

Staphylococcus aureus. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 9, p. 796-804, 2009.

HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006

HAUSSLER, S.; FUQUA, C. Biofilms 2012: New discoveries and significance wrinkles in a dynamic field. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n.13, p.2947-2958, 2013.

KIM, B.Y.; LEE, K.S.; ZOU, F.M.; WAN, H.; CHOI, Y.S.; YOON, H.J.; KWON, H.W.; JE, Y.H.; JIN, B.R. Antimicrobial activity of a honeybee (*Apis cerana*) venom Kazal-type serine protease inhibitor. **Toxicon**, v.76, p. 110-117, 2013.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S.J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. 1-23, 2013.

KOUMANOV, K.; MOMCHILOVA, A.; WOLF, C. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type II secretory phospholipase A2. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 10, p. 871-877, 2003.

LADOKHIN, A.S.; WHITE, S.H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1514, n.2, p.253–260, 2001.

LEE, M.T.; HUNG, W.C.; CHEN, F.Y.; HUANG, H.W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5087-5092, 2008.

LEE, M.T.; SUN, T.L.; HUNG, W.C.; HUANG, H.W. Process of Inducing Pores in Membranes by Melittin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. 14243-14248, 2013.

LINDSAY, J.A.; HOLDEN, M.T. *Staphylococcus aureus*: superbug super genome? **Trends in Microbiology**, v.12, p.378-385, 2004

MARQUES, C.S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.

MARQUES, S.C.; REZENDE, J.G.O.; ALVEZ, L.A.F.; SILVA, B.C.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.

MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 12, p. 6366-6371, 2012

NEVALAINEN, T.J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 1-2, p. 1-9, 2008.

PARK, D.; JUNG, J.W.; LEE, M.O.; LEE, S.Y.; KIM, B.; JIN, H.J.; KIM, J.; AHN, Y.J.; LEE, K.W.; SONG, Y.S.; HONG, S.; WOMACK, J.E.; KWON, H.W. Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Peptides**, v. 53, p. 185-193, 2014

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. **Bioscience Reports**, v.27, n. 4-5, p.189–223, 2007.

SILVA JUNIOR, A.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F.F.T.; GATTI, M.S.V.; DOLDER, H.; SCHUMACHER, R.I.; JULIANO, M.A.; SILVA, M.J.; LEITE A.. Avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptides elected from phage display libraries. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n.1, p. 53-60, 2002

TANG, H.J.; CHEN, C.C.; KO, W.C.; YU, W.L.; CHIANG, S.R.; CHUANG, Y.C. *In vitro* efficacy of antimicrobial agents against high-inoculum or biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with vancomycin minimal inhibitory concentrations equal to 2 µg/mL (VA2-MRSA), **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, n.1, pp.46-51, 2011

TERWILLIGER, T.C.; EISENBERG, D. The structure of melittin: II. Interpretation of the structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 11, p. 6016-6022, 1982.b

TONG, S.Y.C.; DAVIS, J.S.; ELCHENBERGER, E.; HOLLAND, T.L.; FOWLER, V.G. *Staphylococcus aureus* infecções: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology reviews**, v. 28, n. 3, 2015

WU, Y.; MA, L.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; CUI, Q.; CHAPMAN, E.R.I. Permeation of styryldyes through nanometer-scale pores in membranes. **Biochemistry**, v. 50, n. 35, p. 7493–7502, 2011.

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n.6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, N.Z.; QI, J.X.; FENG, S.J.; GAO, F.; LIU, J.; PAN, X.C.; CHEN, R.; LI, Q.R.; CHEN, Z.S.; LI, X.Y.; XIA, C.; GAO, G.F. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-1*0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic T lymphocyte epitope peptides. **Journal of Virology**, v.85, n. 22, p.11709–11724, 2011.

5 Conclusão Geral

- Melitina apresentou-se tóxica para diversas linhagens celulares em concentrações que concordam com a literatura existente, apresentando toxicidade dependente do tempo e da concentração, e que com apenas 5 minutos de exposição à melitina, diversas células já apresentaram sinais de toxicidade.

- A citometria de fluxo e a microscopia confocal foram úteis ao auxiliar a desvendar os mecanismos de toxicidade celular da melitina e revelaram sinais de toxicidade em concentrações inferiores às concentrações consideradas tóxicas pelo ensaio de redução do MTT. Através dessas análises complementares foi possível verificar que a peroxidação das membranas celulares parece iniciar os demais eventos de citotoxicidade como a produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio, a funcionalidade mitocondrial e as taxas de apoptose.

- A melitina ainda apresentou efeito antiviral e virucida contra BoHV-1, enquanto que a apamina não foi capaz de impedir a replicação ou inativar nenhum dos vírus estudados. Porém sua associação com melitina potencializou o efeito virucida contra BoHV-1 e demonstrou ação virucida frente ao BVDV, levando a crer em um efeito sinérgico entre as duas substâncias.

- Melitina ainda apresentou efeito antibacteriano contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e contra os biofilmes formados por estas espécies bacterianas. Ainda foi capaz de interferir na produção de biofilmes por estas bactérias quando foram incubadas previamente com concentrações de melitina inferiores às inibitórias mínimas.

Melitina e apamina apresentam potencial para novos estudos em busca do desenvolvimentos de fármacos e/ou sanitizantes e que os resultados obtidos através dos testes de toxicidade possam contribuir para esse desenvolvimento.

Referências

ABOUDY, Y.; MENDELSON, E.; SHALIT, I.; FRISKIN, M. Activity of two synthetic amphiphilic peptides and magainin-2 against herpes simplex virus types 1 and 2. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 43, n. 6, p. 573-582, 1994.

AL-ANI, I.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. **Phytomedicine**, v. 22, n. 2, p. 245-255, 2015.

ANDERSEN, J.H.; OSBAKK, S.A.; VORLAND, L.H.; TRAAVIK, T.; GUTTENBERG, T.J. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. **Antiviral Research**, v. 51, n. 2, p. 141-149, 2001.

ARQYRIS, E.G.; ACHEAMPONG, E.; NUNNARI, G.; MUKHTAR, M.; WILLIAMS, K.J.; POMERANTZ, R.J. Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. **Journal of Virology**, v. 77, n. 22, p. 12140-12151, 2003.

ASHTHANA, N.; YADAV, S.P.; GHOSH, J.K. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n.53, p. 55042-55050, 2004.

BAHAR, A.A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v.6, p.1543-1575, 2013

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASTIAN, A.; SCHÄFER, H. Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. **Regulatory Peptides**, v. 101, n. 1-3, p. 157-161, 2001.

BELAID, A.; AOUNI, M.; KHELIFA, R.; TRABELSI, A.; JEMMALI, M.; HANI, K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. **Journal of Medical Virology**, v. 66, n. 2, p. 229-234, 2002

BELLO, J.; BELLO, H.R.; GRANADOS, E. Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. **Biochemistry**, v. 21, p. 461-465, 1982.

BENACHIR, T.; LAFLEUR, M. Study of vesicle leakage induced by melittin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1235, p.452–460,1995.

BECHINGER, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p.157-183, 1999.

BENACHIR, T.; LAFLEUR, M. Study of vesicle leakage induced by melittin. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1235, p.452–460,1995.

BENTON, A.W.; MORSE, R.A.; STEWART, J.D. Venom collection from Honey Bees, **Science**, v. 142, p. 228-230, 1963.

BERGDOLL, M.S. **Staphylococcal food poisoning**. In: CLIVER, D.O. (Ed.). Foodborne 449 diseases. London: Academic, p.87-106, 1990.

BOWDISH, D.M.; DAVIDSON, D.J.; SPEERT, D.P.; HANCOCK, R.E. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 6, p. 3758-3765, 2004.

BOWDISH, D.M.; DAVIDSON, D.J.; LAU, Y.E.; LEE, K.; SCOTT, M.G.; HANCOCK, R.E. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 4, p. p. 451-459, 2005.

BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.; MCCRAYP, B.; TACK, B.F. Antimicrobial peptides in animal sand their role in host defences. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 5, p. 465- 478, 2003.

BROWN, L.R.; LAUTERWEIN, J.; WUTHRICH, K. High-resolution ¹H-NMR studies of self-aggregation of melittin in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 622, n. 2, p.231–444, 1980.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98- 106, 2008.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALQUE, C.M S.; HADDAD, J.V. **Animais Peconhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp.(2003).

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

CERNE, K.; ERMAN, A.; VERANIC, P. Analysis of cytotoxicity of melittin on adherent culture of human endothelial cells reveals advantage of fluorescence microscopy over flow cytometry and haemocytometer assay. **Protoplasma**, v.250, n.5, p.1131-1137, 2013.

CHANG, T.L.; VARGAS, J.; DELPORTILLO, A.; KLOTMAN, M.E. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 765-773, 2005.

CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C.S.; SOUZA, F.G.C.; ALVES, F.S.F.; FROTA, I.A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.1, p. 49-56, 2010

CHEN, L.; WEN, Y.M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Sciences**, v.3, n.2, p. 66-73, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v.284, p. 1318-1322, 1999.

CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS P.S. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v.54, n.6, p.442-445, 2002

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto, FUNPEC-Editora.2002. 182 p.

DAHER, K.A.; SELSTED, M.E.; LEHRER, R.I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. **Journal of Virology**, v. 60, n. 3, p. 1068-1074, 1986.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta) - Biomembranes**, v. 1462, n.1-2, p. 71-87, 1999.

DE ABREU, R.M.; SILVA DE MORAES, R.L.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Biochemichal and cytochemical studies of de enzymatic activity the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v. 41, p.172-755, 2010.

DE CLERCQ, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 55-66, 2001.

DEMPSEY, C.E. The actions of melittin on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1031, n.2, p.143-161, 1990.

DESAGHER, S.; MARTINOU J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v.10, p. 369-376, 2000.

DIAS, A.; BOUVIER, D.; CREPIN, T.; MCCARTHY, A.A.; HART, D.J.; BAUDIN, F.; CUSACK, S.; RUIGROK, R.W.H. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 914–918, 2009.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FENÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 393-403, 2011

DOSLER, S.; KARAASLAN, E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 62, p. 32-37, 2014

DOSLER, S.; KARAASLAN, E.; ALEV GERCEKER, A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. **Journal of Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 95-103, 2016.

ENGLER, A.C.; SHUKLA, A.; PURANAM, S.; BUSS, H.G.; JREIGE, N.; HAMMOND P.T. Effects of side group functionality and molecular weight on the activity of synthetic antimicrobial polypeptides. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1666–1674, 2011.

EWAN, P.W. Venom allergy. **Bmj**, v. 316, p. 1365-1368, 1998.

FAULKNER, D.J. 2002. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, v. 19, n. 1, p. 1-49, 2002.

FECHTER, P.; MINGAY, L.; SHARPS, J.; CHAMBERS, A.; FODOR, E.; BROWNLEE, G.G. Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 22, p. 20381–20388, 2003.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2012. 1008p.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015.

GIANSANTI, F.; MASSUCCI, M.T.; GIARDI, M.F.; NOZZA, F.; PULSINELLI, E.; NICOLINI, C.; BOTTI, D.; ANTONINI, G. Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 1, p. 69-73, 2005.

GLATTLI, A.; CHANDRASEKHAR, I.; 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.

GÓMARA, M.J.; NIR, S.; NIEVA, J.L. Effects of sphingomyelin on melittin pore formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1612, n.1, p. 83-89, 2003.

GORDON-GROSSMAN, M.; ZIMMERMANN, H.; WOLF, S.G.; SHAI, Y.; GOLDFARB, D. Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.116, n. 1, p.179–188, 2012.

GORDON-GROSSMAN, M.; GOFMAN, Y.; ZIMMERMANN, H.; FRYDMAN, V.; SHAI, Y.; BEN-TAL, N.; GOLDFARB, D. A combined pulse EPR and monte carlo simulation study provides molecular insight on peptide-membrane interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.113, p.15128, 2009.

GRISOTTO, L.S.; MENDES, G.E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M.A.; ALVES, V.A.; YU, L.; BURDMANN, E.A. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v.48, n.1, p.44-54, 2006.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HABERMANN, E. Bee and wasps venoms. **Science**, v. 177, p.314-322, 1972

HAN, S.; YEO, J.; BAEK, H.; LIN, S.M.; MEYER, S.; MOLAN, P. Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 9, p. 796-804, 2009.

HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006

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.

HAUSSLER, S.; FUQUA, C. Biofilms 2012: New discoveries and significance wrinkles in a dynamic field. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n.13, p.2947-2958, 2013.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000

HEUKELBACH, J.; ALENCAR, C.H.; KELVIN, A.A.; OLIVEIRA, W.K.; CAVALCANTI, L.P.G. Zika virus outbreak in Brazil. **The Journal of Infections in Developing Countries**, v. 10, n. 2, p. 116-120, 2016.

HOOD, L.J.; JALLOUK, A.P.; CAMPBELL, N.; RATNER, L.; WICKLINE, S.A. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 1, p. 95-103, 2013.

HORNE, W.S.; WIETHOFF, C.M.; CUI, C.; WILCOXEN, K.M.; AMORIN, M.; GHADIRI, M.R.; NEMEROW, G.R. Antiviral cyclic D,L-alpha-peptides: targeting a general biochemical pathway in virus infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5445-5143, 2005.

HSU, C.H.; CHEN, C.; JOU, M.L.; LEE, A.Y.; LIN, Y.C.; YU, Y.P.; HUANG, W.T.; WU, S.H. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. **Nucleic Acids Researchs**, v. 33, n. 13, p. 4053-4064, 2005.

HU, H.; CHEN, D.; LI, Y.; ZHANG, X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/C nude in-vivo. **J Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 83-89

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JENSSEN, H.; ANDERSEN, J.H.; MANTZILAS, D.; GUTTENBERG, T.J. A wide range of medium-sized, highly cationic, alpha-helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 119-126, 2004 a.

JENSSEN, H.; ANDERSEN, J.H.; UHLIN-HANSEN, L.; GUTTEBERG, T.J.; REKDAL, Ø. Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. **Antiviral Research**, v. 61, n. 2, p. 101-109, 2004 b.

JO, M.; PARK, M.H.; KOLLIPARA, P.S.; AN, B.J.; SONG, H.S.; HAN, S.B.; KIM, J.H.; SONG, M.J.; HONG, J.T. Anti-cancer effects of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v., 258, n. 1, p. 72-81, 2012

JONES, R.G.; CORTELING, R.L.; BHOGAL, G.; LANDON, J. A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n.3, p. 361-366, 1999.

JORISSEN, B.L.; BROUNS, F.; VAN BOTEL, M.P.; PONDS, R.W.; VERTHEY, F.R.; JOLLES, J.; RIEDEL, W.J. The influence of soy-derived phosphatidylserine on cognition in age-associated memory impairment. **Nutricional Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 121-134, 2001

KANTOR I.N. Dengue, Zika y Chikungunya. **Medicina** (Buenos Aires, Artículo especial). 76:00-00, 2016.

KIM, B.Y.; LEE, K.S.; ZOU, F.M.; WAN, H.; CHOI, Y.S.; YOON, H.J.; KWON, H.W.; JE, Y.H.; JIN, B.R. Antimicrobial activity of a honeybee (*Apis cerana*) venom Kazal-type serine protease inhibitor. **Toxicon**, v.76, p. 110-117, 2013.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S.J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. 1-23, 2013.

KOUMANOV, K.; MOMCHILOVA, A.; WOLF, C. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type II secretory phospholipase A2. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 10, p. 871-877, 2003.

LADOKHIN, A.S.; WHITE, S.H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1514, n.2, p.253–260, 2001.

LEE, M.T.; HUNG, W.C.; CHEN, F.Y.; HUANG, H.W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5087-5092, 2008.

LEE, M.T.; SUN, T.L.; HUNG, W.C.; HUANG, H.W. Process of Inducing Pores in Membranes by Melittin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. 14243-14248, 2013.

LI, Q.L.; ZHAO, Z.H.; ZHOU, D.H.; CHEN, Y.Q.; HONG, W.; CAO, L.Y.; YANG, J.Y.; ZHANG, Y.; SHI, W.; CAO, Z.J.; WU, Y.; YAN, H.; LI W. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1518–1525, 2011.

LIMA, J. S.; REZA, D. L.; TEIXEIRA, S.; COSTA, C. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v.16, n.4, p.225-233, 2003.

LINDSAY, J.A.; HOLDEN, M.T. Staphylococcus aureus: superbug super genome? **Trends in Microbiology**, v.12, p.378-385, 2004

LO, W.C.; HENK, W.G.; ENRIGHT, F.M. Light-microscopic studies of 3T3 cell plasma membrane alterations mediated by melittin. **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 15-26, 1997.

LU, N.Y.; YANG, K.; LI, J.L.; YUAN, B.; MA, Y.Q. Vesicle deposition and subsequent membrane-melittin interactions on different substrates: A QCM-D experiment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1828, n. 8, p. 1918–1925, 2013.

MA, Q.Q.; SHAN, A.S.; DONG, N.; GU, Y.; SUN, W.Y.; HU, W.N.; FENG, X.J. Cell selectivity and interaction with model membranes of Val/Arg-rich peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 7, p. 520–526, 2011.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol. **Biochemical Pharmacology**, v.75, n.1, p.1104-1114, 2008.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.71, n.9, p.1289-1298, 2006.

MARDBERG, K.; TRYBALA, E.; TUFARO, F.; BERGSTRÖM, T. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 2, p. 291-300, 2002.

MARKOVIC-HOUSLEY, Z.; MIGLIERINI, G.; SOLDATOVA, L.; RIZKALLAH, P.J.; MULLER, U. SCHIRMER, T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. **Structure**, v.8, n.10, p.1025-1035, 2000.

MARQUES, C.S. **Formação de Biofilmes por Staphylococcus aureus na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.

MARQUES, S.C.; REZENDE, J.G.O.; ALVEZ, L.A.F.; SILVA, B.C.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.

MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 12, p. 6366-6371, 2012

MCCANNL, K.B.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; COVENTRY, M.J. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 1026-1033, 2003.

METTENLEITER T.C. Brief overview on cellular virus receptors. **Virus Research**, v. 82, n. 1-2, p. 3-8, 2002.

MINGARRO, I.; PEREZ-PAYA, E.; PINILLA, C.; APPEL, J.R.; HOUGHTEN, R.A.; BLONDELLE, S.E. Activation of bee venom phospholipase A2 through a peptide-enzyme complex. **FEBS Letters**, v.372, n.1, p.131-134, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Brasil. 2015. **Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia**. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>>. Acesso em 07 mar. 2016.

MOLLAY, C.; KREIL, G.; BERGER, H. Action of phospholipases on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Stimulation by melittin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 426, n. 2, p. 317-324, 1976.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.105-111, 2001.

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

MULLER, U.; FRICKER, M.; WYMAN, D.; BLASER, K.; CRAMERI, R. Increased specificity of diagnostic tests with recombinant major bee venom allergen phospholipase A2. **Clinical & Experimental Allergy**, v.27, n.8, p.915-920, 1997.

NEVALAINEN, T.J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 1-2, p. 1-9, 2008.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v.47, p.451–463, 1998.

OWNBY, C.L.; POWELL, J.R.; JIANG, M.S.; FLETCHER, J.E. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle *in vivo*. **Toxicology**, v.35, n.1, p.67-80, 1997.

PARK, D.; JUNG, J.W.; LEE, M.O.; LEE, S.Y.; KIM, B.; JIN, H.J.; KIM, J.; AHN, Y.J.; LEE, K.W.; SONG, Y.S.; HONG, S.; WOMACK, J.E.; KWON, H.W. Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Peptides**, v. 53, p. 185-193, 2014

PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; de GRAAF, D.C.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; JACOBS, F.J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1752, .1, p. 1-5, 2005.

PETROIANU, G.; LIU, J.; HELFRICH, U.; MALECK, W.; RUFER, R. Phospholipase A2-induced coagulation abnormalities after bee sting. **American Journal of Emergency Medicine**, v.18, n.1, p.22-27, 2000.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; WEITZE, K.F.; BEYERBACH, M.; PETERSON, E.T.; WABERSKI, D. Detection of cooling-induce membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2278-2299, 2005

PIETRANTONI, A.; AMMENDOLIA, M.G.; TINARI, A.; SICILIANO, R.; VALENTI, P.; SUPERTI, F. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 *in vitro* infection. **Antiviral Research**, v. 69, n. 2, p. 98-106, 2006.

PRATT, J.P.; RAVNIE, D.J.; JIANG, X.; OROZCO, B.S.; MENTZER, S.J. Melittin-induced membrane permeability: a non osmotic mechanism of cell death. **In vitro cellular & development biology**, v. 41, p. 349-355, 2005.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 134, n.2, p.183-189, 2005.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. **Bioscience Reports**, v.27, n. 4-5, p.189–223, 2007.

RAPOPORT, R.M.; ASHRAF, M.; MURAD, F. Effects of melittin on endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta. **Circulation Research**, v. 64, n. 3, p. 463-473, 1989

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938

ROBINSON, W.E.; MCDOUGALL, B.; TRA, D.; SELSTED, M.E. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, n. 1, p. 94-100, 1998.

RUIGROK, R.W.H.; CREPIN, T.; HART, D.J.; CUSACK, S. Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. **Current Opinion of Structural Biology**, v. 20, n. 1, p. 104–113, 2010.

SAINI, S.S.; PETERSON, J.W.; CHOPRA, A.K. Melittin binds to secretory phospholipase A2 and inhibits its enzymatic activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 2, p. 436-442, 1997.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCOTT, M.G.; DAVIDSON, D.J.; GOLD, M.R.; BOWDISH, D; HANCOCK, R.E. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3883-3891, 2002.

SENGUPTA, D.; MEINHOLD, L.; LANGOSCH, D.; ULLMANN, G.M.; SMITH, J.C. Understanding the energetics of helical peptide orientation in membranes. **Proteins**, v.58, n.4, p.913-922, 2005.

SHERMAN, R.A. What physicians should know about Africanized honeybees. **Western Journal of Medicine**, v. 163, n.6, p. 541-546, 1995.

SHIEH, M.T.; WUDUNN, D.; MONTGOMERY, R.I.; ESKO, J.D.; SPEAR, P.G. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. **The Journal of Cell Biology**, v. 116, n. 5, p. 1273-1281, 1992.

SILVA JUNIOR, A.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F.F.T.; GATTI, M.S.V.; DOLDER, H.; SCHUMACHER, R.I.; JULIANO, M.A.; SILVA, M.J.; LEITE A.. Avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptides elected from phage display libraries. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n.1, p. 53-60, 2002

SKALICKOVA, S.; HEGER, Z.; KREJCOVA, L.; PEKARIK, V.; BASTL, K.; JANDA, J.; KOSTOLANSKY, F.; VARECKOVA, E.; ZITKA, O.; ADAM, V.; KIZEK, R. Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus. **Viruses**, v. 7, n. 1, p. 5428-5442, 2015.

SONG, Y.M.; PARK, Y.; LIM, S.S.; YANG, S.T.; WOO, E.R. PARK, I.S.; LEE, J.S.; KIM, J.I.; HAHM, K.S.; KIM, Y.; SHIN, S.Y. Cell selectivity and mechanism of action of antimicrobial model peptides containing peptoid residues. **Biochemistry**, v. 44, n. 36, p. 12094-12106, 2005.

SPILLMANN, D. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? **Biochimie**, v. 83, n. 8, p. 811-817, 2001.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

SU, M.; HE, C.; WEST, C.A.; MENTZER, S.J. Cytolytic peptides induce biphasic permeability changes in mammalian cell membranes. **Journal of Immunological Methods**, v.252, n. 1-2, p. 63-71, 2001.

TAMAMURA, H.; MURAKAMI, T.; MASUDA, M.; OTAKA, A.; TAKADA, W.; IBUKA, T.; NAKASHIMA, H.; WAKI, M.; MATSUMOTO, A.; YAMAMOTO, N. Structure-activity relationships of an anti-HIV peptide, T22. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 205, n. 3, p. 1729-1735, 1994.

TAMAMURA, H.; ISHIHARA, T.; OTAKA, A.; MURAKAMI, T.; IBUKA, T.; WAKI, M.; MATSUMOTO, A.; YAMAMOTO, N.; FUJII, N. Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr5, 12, Lys7]-polyphemusin II), with gp120 and CD4 by surface plasmon resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1298, n. 1, p. 37-44, 1996.

TANG, H.J.; CHEN, C.C.; KO, W.C.; YU, W.L.; CHIANG, S.R.; CHUANG, Y.C. *In vitro* efficacy of antimicrobial agents against high-inoculum or biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with vancomycin minimal inhibitory concentrations equal to 2 µg/mL (VA2-MRSA), **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, n.1, pp.46-51, 2011

TONG, S.Y.C.; DAVIS, J.S.; ELCHENBERGER, E.; HOLLAND, T.L.; FOWLER, V.G. *Staphylococcus aureus* infecções: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology reviews**, v. 28, n. 3, 2015

TERRA, R.M.; GUIMARÃES, J.A.; VERLI, H. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. **Journal of molecular graphics and modelling**, v.25, n.6, p. 767-772, 2006

TERWILLIGER, T. C.; WEISSMAN, L.; EISENBERG, D. The structure of melittin in the form I crystal and its implication for melittin's lytic and surface activities. **Biophysical Journal**, v. 37, n. 1, p.353–361, 1982. a

TERWILLIGER, T.C.; EISENBERG, D. The structure of melittin: II. Interpretation of the structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 11, p. 6016-6022, 1982.b

TOSTESON, M.T.; HOLMES, S.J.; RAZIN, M.; TOSTESON, D.C. Melittin lysis of red cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 87, n.1, p. 35-44, 1985.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELLINGSPPERGER, C.; A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995

VETTER, R.S. VISSCHER, P.K.; CAMAZINE, S. Mass envenomations by honey bees and wasps. **Western Journal of Medicine**, v. 170, n.4, p. 223-227, 1999.

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, n. 4, p. 731-740, 1998.

WESTON, K.M.; RAISON, R.L. Interaction of melittin with a human lymphoblastoid cell line, HMy2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 164-173, 1998

WINNINGHAM, K.M.; FITCH, C.D.; SCHMIDT, M.; HOFFMAN, D.R. Hymenoptera venom protease allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n.4, p.928-933, 2004.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.7, n.1, p. 2-15, 1996.

WU, Y.; MA, L.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; CUI, Q.; CHAPMAN, E.R.I. Permeation of styryldyes through nanometer-scale pores in membranes. **Biochemistry**, v. 50, n. 35, p. 7493–7502, 2011.

WUDUNN, D.; SPEAR, P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. **Journal of Virology**, v. 63, n. 1, p. 52-58, 1989.

YANG, L.; HARROUN, T.A.; WEISS, T.M.; DING, L.; HUANG, H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, v.81, n.3, p.1475-1485, 2001.

YASIN, B.; PANG, M.; TURNER, J.S.; CHO, Y.; DINH, N.N.; WARING, A.J.; LEHRER, R.I.; WAGAR E.A. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 187-194, 2000.

YASIN, B.; WANG, W.; PANG, M.; CHESHENKO, N.; HONG, T.; WARING, A.J.; HEROLD, B.C.; WAGAR, E.A.; LEHRER, R.I. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. **Journal of Virology**, v. 78, n. 1, p. 5147-5156, 2004.

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003

YUAN, P.W.; BARTLAM, M.; LOU, Z.Y.; CHEN, S.D.; ZHOU, J.; HE, X.J.; LV, Z.Y.; GE, R.W.; LI, X.M.; DENG, T.; FODOR, E.; RAO, Z.; LIU, Y. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(n) reveals an endonuclease active site. **Nature**, v. 458, p. 909–913, 2009.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n.6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, N.Z.; QI, J.X.; FENG, S.J.; GAO, F.; LIU, J.; PAN, X.C.; CHEN, R.; LI, Q.R.; CHEN, Z.S.; LI, X.Y.; XIA, C.; GAO, G.F. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-1*0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic t lymphocyte epitope peptides. **Journal of Virology**, v.85, n. 22, p.11709–11724, 2011.

ZHOU, J.; QI, Y.; DIAO, Q.; WU, L.; DU, X.; LI, Y.; SUN, L. Cytotoxicity of melittin and apamin in human hepatic L02 and HepG2 cells in vitro. **Journal of Toxicology Toxin Reviews**, v. 32, n. 4, p. 60-67, 2013