

---

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

---

**MICHELE PERISATTO BERRETA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO,  
GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA MELITINA  
EM CULTURA DE CÉLULAS.**

MICHELE PERISATTO BERRETA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E  
MUTAGÊNICO DA MELITINA EM CULTURA DE CÉLULAS.

Orientador: Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Co-orientador: Dra. Márcia Miyuki Hoshina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de  
Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2015

595.799 Berreta, Michele Perisatto  
B533a Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da melitina em cultura de células. / Berreta, Michele Perisatto. - Rio Claro, 2015

43 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Aparecida Marin Morales

Coorientador: Márcia Miyuki Hoshina

1. Abelha. 2. Toxicidade de produtos naturais. 3. Ensaio do cometa. 3. Ensaio do MTT. 4. Estresse oxidativo. 5. HepG2. 6. Teste do micronúcleo.  
I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

*Dedico esse trabalho aos  
meus amados pais  
Oscar e Elíana.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Oscar e Eliana, por estarem sempre presentes, sempre apoiando todas minhas decisões, sendo meus pai/mãe-torista, meus pai/mãe-trocínio, por todos os valores ensinados que me ajudaram a me tornar a pessoa que sou hoje, sempre me incentivando a buscar o “algo a mais” e, acima de tudo, por todo o amor incondicional que sempre me deram. Vocês são exemplos que quero seguir e espero sempre orgulhá-los disso. Sem vocês eu não teria alcançado essa conquista.

Aos meus familiares, tias e tios, primas e primos, que de alguma forma acompanharam meu caminho, que ajudaram no meu crescimento e me proporcionaram boas lembranças.

Ao meu namorado Gabriel por sempre estar presente me apoiando e por me aguentar nos meus piores momentos, por me escutar e me entender, me apoiar, por todas as palhaçadas, bobagens e me fazer muito feliz. Obrigada também por todo o companheirismo e cumplicidade.

À Rose e ao Amauri por terem me “adotado” e me permitido fazer parte dessa família maravilhosa, por todo o incentivo, apoio, carinho e amizade.

À minha querida orientadora Marin por ter me acolhido no grupo, por todos os ensinamentos passados, por todas as críticas que me ajudaram a evoluir, por sempre acreditar no meu potencial, acreditar no meu trabalho e sempre me incentivar, por toda a amizade, toda dedicação e todo carinho.

À minha querida co-orientadora Márcia por toda a paciência de me ensinar e aturar meu “amor” pelo ensaio do Cometa, por todas as dicas e sugestões, por todos os “puxões de orelha”, não só dentro do laboratório, por ter se tornado essa grande amiga que é hoje e que tenho grande respeito e admiração. Obrigada por me ajudar com esse trabalho e por acreditar em mim.

Às minhas amigas de todas as horas Cris, Lais, Márcia, Maria Tereza, Nádia e Raquel por estarem sempre comigo, por me acolherem, me aconselharem, me fazerem rir (principalmente com as pérolas da Raquel), me ouvirem, me mostrarem que uma situação ruim sempre pode piorar, e disso ainda sair várias piadas, por serem muito especiais e indispensáveis na minha vida. Agradeço todos os momentos que passamos juntas, bons e ruins, por todo carinho e pela amizade de sempre.

Ao “chefe” Matheus por ter colado aquele cartaz que fez com que eu descobrisse a existência desse grupo maravilhoso, por ter me recebido, sempre me ajudado, pelas conversas, discussões, amizade e tentativas de me ensinar a tal da estatística.

Aos amigos de longa data Aira, Mariana, Andréa e Luis Roberto por terem me acompanhado em toda essa jornada, por sempre me apoiarem, por todos os momentos felizes e engraçados, pelos ruins também, por toda a amizade e carinho de sempre. Obrigada por terem tornado meus dias mais leves e felizes.

Aos grupo Cris, Dânia, Lais, Leonardo, Márcia, Maria Tereza, Matheus, Nádia, Raquel pelos longos, gordos e divertidos sábados de experimentos.

Aos amigos mutagênicos: Ana Claudia, Bruna, Camila, Cintya, Cleiton, Cris, Cristina, Dânia, Fernanda, Franco, Jaque, Jorge, Lais, Leonardo, Letícia, Livia, Luiza, Maria Paula, Maria Tereza, Matheus, Márcia, Nádia, Paula, Raphael, Raquel, Samantha, Thais F., Thays G., Vinicius por fazerem parte desta etapa, por toda a convivência, conversas e risadas e por poder contar sempre com vocês.

Aos amigos e companheiros de aulas Ana, Ariane, Cassy, Day, Gabi, Jhonny, Juliana, Helo, Lucia, Nahanna por terem feito parte dessa jornada e por tornarem as noites mais engraçadas e menos tediosas.

À Roberta e ao Gerson por toda a ajuda prestada, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

Aos amigos que fiz durante meu intercâmbio Dr. Roland, Elaine, Melisa, Mukund, Neel, Rafael, Joan, Patricia, Alison, Eziah, Carol, Steve, Dra. Shauna, Dr. Robert, Ian, Kyle, Carmen, Linda por todo carinho, toda atenção e amizade, por todos os ensinamentos e todas as boas lembranças.

À profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti por todo o ensinamento, por toda a ajuda e pela amizade.

Ao prof. Dr. Pedro Luis Rodrigues de Moraes por todo o ensinamento, por toda a ajuda e pela amizade e momentos de descontração.

À profa. Dra. Karen C. Martinez de Moraes por toda a ajuda prestada, pelos conselhos, dicas, ensinamentos e pela amizade.

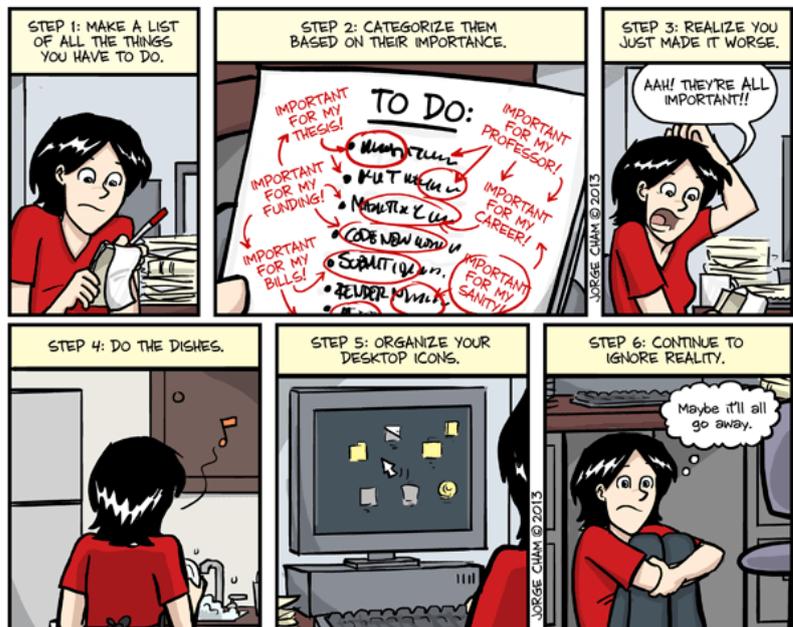
À todos os professores e funcionários da UNESP, os quais tive o prazer de conhecer e conviver ao longo dessa jornada.

Ao prof. Msc. Acácio Antonio Pigoso pela paciência e prontidão de ensinar e ajudar na técnica de estresse oxidativo, e auxiliar na discussão dos resultados.

À FAPESP pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma estiveram comigo ao longo desses anos e que me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho.

## WHAT TO DO WHEN YOU'RE OVERWHELMED WITH WORK



## RESUMO

Atualmente, é de conhecimento popular que produtos naturais possam apresentar mais benefícios a saúde do que químicos sintéticos. Um exemplo disso é o que pode ser visto com respeito ao veneno de abelha, um produto apícola que vem sendo muito utilizado, há muito tempo, na medicina oriental tradicional para o tratamento de artrites e dores. Porém, recentemente, o veneno de abelha tem também sido utilizado também pela indústria de cosméticos, devido ao seu potencial efeito sobre a pele, na redução de rugas. Dentre os compostos do veneno de abelha, a melitina é a substância encontrada em maior quantidade. O uso do veneno como fármaco se deve as características da melitina, pois esta induz um aumento da circulação sanguínea e, conseqüentemente, atua na maior produção de colágeno e elastina, eliminando as células mortas e reduzindo as rugas. Hoje, sabe-se que a melitina também age sobre células saudáveis, causando seu rompimento, uma vez que se liga à membrana plasmática formando poros d'água ou aumentando a permeabilidade celular. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da melitina em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Neste estudo foram desenvolvidos ensaios do MTT, do Azul de Tripán e de estresse oxidativo (citotoxicidade); ensaio do cometa (genotoxicidade) e teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (mutagenicidade). Para o teste do MTT, realizado com a melitina, foram utilizadas as seguintes concentrações: 5,0 µg/mL, 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,005 µg/mL, 0,0005 µg/mL. Destas concentrações, apenas a de 5,0 µg/ml foi citotóxica para as células. As demais concentrações (1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,05 µg/mL) tiveram viabilidade celular maior que 80%, portanto utilizadas nos ensaios do cometa, MN e estresse oxidativo. No ensaio do Cometa nenhuma das concentrações testadas apresentou potencial genotóxico sobre as células, o que nos permite concluir que essas concentrações não foram capazes de induzir dano ou, se houve indução de dano, as células foram capazes de se recuperar no período de 24 horas em que ficaram expostas. Ao utilizar as mesmas concentrações no teste do MN, observou-se que apenas a concentração de 1,0 µg/mL (a mais alta testada) apresentou potencial mutagênico sobre as células HepG2. Na avaliação da atividade da CAT, as concentrações de 1,0 µg/mL e 0,05 µg/mL se mostraram capazes de aumentar a atividade dessa enzima. Na avaliação da atividade da SOD, apenas a concentração de 1,0 µg/mL apresentou um valor significativo, em relação ao controle negativo, indicando um aumento na atividade dessa enzima. Já na avaliação da atividade da GST, não houve variação da absorbância durante o tempo de 5 minutos, portanto o teste não ofereceu resultados conclusivos. No ensaio do TBARS, todas as concentrações tiveram valores próximos ao controle negativo, porém esses resultados também foram considerados inconclusivo.

**Palavras-chave:** Ensaio do cometa, ensaio do MTT, estresse oxidativo, HepG2, teste do micronúcleo, veneno de abelha.

## ABSTRACT

Currently, it is popular knowledge that natural products can provide more health benefits than synthetic chemicals. An example of this is what can be seen with respect to bee venom, which is a bee product and has been widely used, long ago, in traditional Oriental medicine for the treatment of arthritis and pain. However, recently, bee venom has also been used on cosmetic industries due to its potential effect on the skin on reducing wrinkles. Among compounds from bee venom, melittin is its major constituent. This use of the bee venom is given by the melittin characteristic of inducing an increase on blood circulation and, consequently, acts on the production of collagen and elastin, removing dead cells and reducing wrinkles. Nowadays, it is known that it acts on healthy cells, disrupting them, once melittin binds on plasmatic membrane forming water pores or increasing cell permeability. Thus, the present study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of melittin in human hepatocarcinoma cells (HepG2). In this study, MTT test, Trypan blue and oxidative stress assays (cytotoxicity); the comet assay (genotoxicity) and the micronucleus with cytokinesis block assay (mutagenicity) were performed. For the MTT assay (cytotoxicity test) with melittin the following concentrations were tested: 5.0 µg/mL, 1.0 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.005 µg/mL, 0.0005 µg/mL. Of these, only the concentration of 5.0 µg/mL was cytotoxic to the cells. The other concentrations (1.0 µg/mL, 0.5 µg/mL and 0.05 µg/mL) had a cell viability higher than 80%, so they were used on comet, MN and oxidative stress assays. In the Comet assay, none of them showed genotoxic potential to cells, which allows to conclude that these concentrations were not able to induce damage or, if there was damage induction, the cells were able to recover in the 24 hour period that they were exposed to melittin. When using the same concentrations on the MN assay, it was observed that only the concentration of 1.0 µg/mL (the highest tested) showed mutagenic potential on HepG2 cells. In the evaluation of CAT activity, the concentrations of 1.0 µg/mL and 0.05 µg/mL showed to be capable of raising the activity of this enzyme. In the evaluation of SOD activity, only the concentration of 1.0 µg/mL showed a significant value in comparison to negative control, indicating an increase in this enzyme activity. In the evaluation of the GST activity, there was no variation on the absorbance during 5 minutes and, therefore, it was not conclusive. In the TBARS assay, all concentrations had values near to the negative control, being this result also inconclusive.

**Key words:** Bee venom, comet assay, HepG2, micronucleus test, MTT test, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos tratamentos na placa de ELISA de 96 poços para o teste do MTT .....	20
Figura 2 – Viabilidade (%) obtida no teste do MTT de células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina .....	27
Figura 3 – Imagens do cometa de células HepG2 coradas com GelRed® .....	29
Figura 4 – A. Célula binucleada normal; B. Célula binucleada com ponte nucleoplasmáticas; C. Células binucleada com broto, D. Célula binucleada com micronúcleo .....	31
Figura 5 – Valores da atividade da SOD por minuto obtidos para a linhagem HepG2, após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de melitina .....	33
Figura 6 – Valores da atividade da Catalase por minuto obtidos para a linhagem HepG2, após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de melitina .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média de absorvância e viabilidade celular referente ao ensaio colorimétrico do MTT, realizado em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina.....	26
Tabela 2 – Porcentagem da viabilidade das células HepG2, obtida pelo teste de exclusão do corante azul de Tripán, após 24 horas de tratamento .....	28
Tabela 3 – Ensaio do cometa com células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina.....	29
Tabela 4 – Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, realizado com células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina por 24 horas .....	32
Tabela 5 – Valores de absorvância obtidos no teste do TBARS para a linhagem HepG2, após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de melitina .....	36

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	19
3.1	Material Biológico .....	19
3.2	Bioensaios com células HepG2 (Hepatocarcinoma Humano) .....	19
3.3	Melitina .....	19
3.3.1	<i>Tratamentos</i> .....	19
3.4	Teste do MTT .....	20
3.5	Ensaio do Cometa .....	21
3.6	Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese .....	23
3.7	Ensaio do Estresse Oxidativo .....	23
3.7.1	<i>Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)</i> .....	24
3.7.2	<i>Avaliação da atividade da catalase (CAT)</i> .....	24
3.7.3	<i>Avaliação da atividade da glutathione S-transferase (GST)</i> .....	24
3.7.4	<i>Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> ..	25
3.9	Análises Estatísticas .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
4.1	Teste do MTT .....	26
4.2	Ensaio do Cometa .....	27
4.3	Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese .....	30
4.4	Ensaio do Estresse Oxidativo .....	33
4.4.1	<i>Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)</i> .....	33
4.4.2	<i>Avaliação da atividade da catalase (CAT)</i> .....	34
4.4.3	<i>Avaliação da atividade da glutathione S-transferase (GST)</i> .....	35
4.4.4	<i>Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> ..	35
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	37

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
--	-----------

## 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

O veneno de abelha é amplamente utilizado na medicina oriental para o tratamento de diversas doenças, sendo um composto alvo de muitas investigações, principalmente as relacionadas com as propriedades medicinais de suas substâncias (MOON et al., 2007; SON et al., 2007; CHEN; LARIVIERE, 2010). Recentemente, este veneno tem sido utilizado em cosméticos, para minimizar as rugas, funcionando como “Botox” natural. De acordo com os estudos realizados por Han et al. (2011) em camundongos, o veneno de abelha acelera a cicatrização dérmica, devido à indução de um aumento na expressão da proteína colágeno-I.

Lee et al. (2007) mostraram que o veneno de abelha pode causar danos ao sistema enzimático, atuar na dilatação e contração de vasos sanguíneos e desencadear processos inflamatórios. Além disso, o veneno mostrou ter um alto potencial citotóxico para linfócitos humanos, comprovado pelos testes do micronúcleo e de fragmentação de DNA.

O veneno de abelha é constituído, basicamente, de melitina, fosfolipase A<sub>2</sub>, histamina, hialuronidase, catecolamina e serotonina (JUNIOR et al., 2010), sendo que a melitina corresponde de 40 a 50 % do volume total do veneno. Segundo Terwilliger e Eisenberg (1982), a melitina é um pequeno peptídeo de estrutura primária ( $\alpha$ -hélice), constituído de 26 aminoácidos, conforme a sequência: NH<sub>2</sub>-Gly<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Ala<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Leu<sup>6</sup>-Lys<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Thr<sup>10</sup>-Thr<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-Pro<sup>14</sup>-Ala<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup>-Ile<sup>17</sup>-Ser<sup>18</sup>-Trp<sup>19</sup>-Ile<sup>20</sup>-Lys<sup>21</sup>-Arg<sup>22</sup>-Lys<sup>23</sup>-Arg<sup>24</sup>-Gln<sup>25</sup>-Gln<sup>26</sup>-CONH<sub>2</sub>

Sabe-se hoje que o veneno de abelha é efetivo no tratamento de artrite e reumatismo, devido à ação da melitina, a qual estimula as glândulas supra renais a produzirem o cortisol, um hormônio corticosteroide que possui ação anti-inflamatória (MOON et al, 2007; SON et al, 2007). Além disso, tem importante ação contra tumores, pois é capaz de se ligar à membrana da célula tumoral e causar sua lise ou sua apoptose (VICK; SHIPMAN, 1972; SON et al., 2007). No entanto, a melitina também afeta células saudáveis, pois, apesar de ser solúvel em água, ela é capaz de se ligar à bicamada lipídica pela terminação carboxi, que é polar (TERWILLIGER; EISENBERG, 1982), agindo como um detergente e levando a um aumento da permeabilidade dos poros de água da membrana, causando rompimento dessa estrutura celular (GLÄTTLI et al., 2006).

Qian e Heller (2015) verificaram que em concentrações inferiores às capazes de formar poros, esse peptídeo é capaz de alterar a distribuição de colesterol e lipídeos dispostos em vesículas unilamelares. Foi observada a redistribuição do colesterol quando este estava em concentrações altas e o peptídeo em concentrações baixas, devido a um efeito adicional não observado para outros peptídeos, como a alametina, sugerindo que essa mudança seja um limiar para a lise da célula (QIAN; HELLER, 2015).

Isso se deve ao efeito que a proporção peptídeo/lipídeo tem sobre a ligação da melitina à membrana, sendo que, em baixas proporções à molécula de melitina adota uma conformação helicoidal, enquanto que em proporções mais elevadas assume uma reorientação da molécula para uma conformação transmembranar, o que pode levar a formação de poros (IRUDAYAM et al., 2013; JAMASBI, et al., 2016).

No experimento realizado por Ross et al. (1987) com larvas de *Heliothis zea* (lagarta da espiga do milho) expostas à melitina por 24 e 48 horas, os autores observaram que este peptídeo se mostrou, para estes tempos, 36% e 55%, respectivamente, mais tóxico que o veneno bruto de abelha, além de também ter inibido em 50% o crescimento das larvas, quando estas foram expostas por quatro dias à melitina, enquanto que o veneno bruto causou apenas uma inibição transitória.

A citotoxicidade, ou potencial citotóxico, é a capacidade de um agente induzir um efeito nocivo sobre as células. Os testes que avaliam toxicidade baseiam-se em colocar um material biológico (células de mamíferos, por exemplo) em contato direto ou indireto com o xenobionte e avaliar as alterações que esses agentes podem induzir neste bioindicador exposto a ele. Esses testes podem ser feitos tanto por meio de incorporação de corantes nas células ou pela observação de formação colônias do organismo exposto (ROGERO et. al., 2003). Assim, podemos dizer que compostos altamente citotóxicos têm a capacidade de inibir totalmente o processo de divisão celular (CORROQUÉ, 2014) ou até mesmo matar as células, o que pode ser evidenciada pela avaliação da viabilidade celular do organismo que foi exposto ao agente indutor da citotoxicidade.

O ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5dimetiltiliazil-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um teste indicado para avaliar a potencial interferência de um agente sob a viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Este teste permite, determinar quais as concentrações

de uma dada substância são citotóxicas para as células estudadas. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio) é um sal solúvel que, quando metabolizado pela enzima succinato desidrogenase presente na membrana interna da mitocôndria, é reduzido em formazan, que é um produto insolúvel e de coloração roxa. Portanto, apenas células vivas tem capacidade de acumular e reduzir o MTT (HARBELL et al., 1997; STOKERT et al., 2012).

Para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade, de um agente bioativo, são utilizados alguns bioensaios, como o ensaio do cometa e do micronúcleo, respectivamente, testes estes considerados rápidos e eficazes para esses fins.

A genotoxicidade de uma determinada substância, composto ou mistura se dá pela sua capacidade de induzir danos na molécula de DNA, mesmo sendo esses danos passíveis de reparo pelo sistema celular.

Para verificar essa capacidade é utilizado o ensaio do cometa, onde as células são colocadas em lâminas cobertas por agarose, passam por um processo de lise e são submetidas a uma corrente elétrica (COLLINS, 2004; HOVHANNISYAN, 2010). Se o DNA nuclear destas células tiver sofrido alguma quebra na sua estrutura, os fragmentos derivados da quebra serão então arrastados por esta corrente elétrica em direção ao polo positivo. A migração dos fragmentos forma uma imagem semelhante a um cometa, onde o material que está presente no núcleo, chamado de nucleóide, seria o corpo do cometa e os fragmentos arrastados a sua cauda (COLLINS, 2004). Este teste ganhou popularidade por ser um teste muito sensível, capaz de detectar baixos níveis de dano no DNA de células individuais (SINGH et al., 1988). Esta técnica, que requer um número reduzido de células e pode ser aplicado em qualquer fase do ciclo de divisão celular (FAIRBAIRN et al., 1995; PAVLICA et al., 2001), foi realizado pela primeira vez por Rydberg e Johanson em 1978 e teve seu protocolo adaptado para células de mamíferos por Östling e Johanson em 1984 (COTELLE; FÉRARD, 1999).

A mutagenicidade pode ser definida como a capacidade de um agente causar danos e/ou mutações irreversíveis no DNA. A grande maioria dos agentes mutagênicos promovem, aceleram ou aumenta as mutações no DNA, podendo alterar o material genético em qualquer fase do ciclo celular (OBE et. al., 1982; CORROQUÉ, 2014). Havendo um processo de replicação do DNA, logo após o acontecimento da mutação, esta irá ser fixada (OBE et. al., 1982).

O micronúcleo (MN) é uma pequena massa de cromatina delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Ele surge em decorrência de danos no material genético nuclear (perda de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros), que se separam do núcleo principal durante a mitose, se condensam e são envolvidos por membranas biológicas (FENECH et al., 1997).

A citocalasina B é uma substância que impede a citocinese, pela inibição da polimerização da actina, mas não inibe a divisão nuclear da célula (CHEONG et al., 2013). Com isso, é possível verificar se uma célula exposta a um determinado agente, após divisão nuclear, possui micronúcleo e, assim, estimar se o agente analisado apresenta ou não efeito mutagênico (FENECH; MORLEY, 1985). Pelo teste do micronúcleo também é possível observar a presença de pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares, os quais podem ser usados para avaliar diferentes tipos de danos no DNA (CHEONG et al., 2013).

Além dos testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, outros testes também são capazes de avaliar os efeitos celulares de compostos químicos, como os testes que avaliam a indução de estresse oxidativo. Estes testes são utilizados para quantificar o dano causado pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem causar danos em biomoléculas como o DNA, lipídios e proteínas (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010; HARA, 2012).

A determinação dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) é usada para quantificação da peroxidação lipídica, como é o caso do malondialdeído (MDA), um composto carbonil reativo que é produto da lipoperoxidação (PLAYER et al., 1979; OAKES; VAN DER KRAAK, 2003). Peróxidos de lipídios de ácido graxos polinsaturados são instáveis e, ao se decomporem, formam compostos complexos, como o MDA, que pode modificar a membrana de estruturas biológicas, alterando sua permeabilidade e fluidez, como também o transporte de íons e processos metabólicos (ARMSTONG; BROWNE, 1994; NIGAM; SCHEWE, 2000).

Outros ensaios de estresse oxidativo também são realizados para avaliação de alteração da atividade das enzimas superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT). A SOD é uma enzima encontrada tanto em células animais quanto vegetais, que impede a ação tóxica dos radicais superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), que são extremamente reativos sobre as células, convertendo-os em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (NAGAMI et al., 2005; ASSADY et al., 2011). Em animais, essa enzima

ocorre em alta concentração no cérebro, fígado, coração, eritrócitos e rins (SANDSTROM et al., 1994).

Já a CAT é uma enzima antioxidante presente em grande parte das células aeróbicas, sendo encontradas em maiores quantidade no fígado, rins e eritrócitos (JOHANSSON; BORG, 1988). Ela é responsável por transformar o peróxido de hidrogênio em água (H<sub>2</sub>O) e oxigênio (O<sub>2</sub>), compostos estes não-tóxicos para a célula (BÖHMER et al., 2011). Além disso, as células têm outro importante antioxidante: a glutathiona. Ela pode ser encontrada em duas formas no organismo: a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona dissulfido (GSSH), que é a sua forma oxidada (ROUŠAR et. al., 2012). A sua forma reduzido é capaz de catalisar a conjugação de vários compostos eletrofílicos endógenos e exógenos, de forma a prevenir danos provenientes da toxicidade desses compostos (JACOBY, 1977; CHASSEAUD, 1979).

Os testes descritos acima podem ser aplicados em diversos sistemas biológicos, dentre eles as células mantidas em cultura celular, sendo que as mais comumente utilizadas são as derivadas de sistemas biológicos de mamíferos. Dentre as diferentes linhagens celulares utilizadas nos testes *in vitro*, podemos destacar a célula HepG2 (derivada de hepatocarcinoma humano). Diferentemente de muitas linhagens, por esta ser célula de fígado, ela é capaz de metabolizar a substância à qual foi exposto, o que pode indicar, de forma mais fiel, os efeitos celulares promovidos pela substância (LAMY et al., 2004). A capacidade de metabolização da linhagem HepG2 é uma das características desta célula, que é geralmente perdida em outras linhagens celulares. Esta característica a torna uma linhagem amplamente diferenciada (KNOWLES et al., 1980) e vantajosa para estudos de toxicidade. Além disso, essa linhagem mantém sua morfologia semelhante ao epitélio e parênquima hepático.

Como a melitina pode apresentar tanto efeitos benéficos como danosos para as células, torna-se evidente a necessidade de se realizar investigações mais criteriosas sobre a bioatividade desta substância, para que se possa estimar as reais potencialidades de seu uso, seja na terapêutica ou na cosmética. Assim, é muito importante a realização de ensaios que avaliem a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do produto, pois estes permitirão determinar os efeitos da melitina sobre o material genético dos organismos eventualmente expostos a ela.

Assim, de acordo com o acima mencionado, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial da melitina em induzir danos no material genético e estresse oxidativo em células HepG2 mantidas em cultura.

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista que a melitina pode ter diferentes efeitos tanto negativos quanto positivos sobre as células e organismos, este estudo investigou a atividade desta substância sobre as células HepG2 mantidas em cultura, para estimar:

- ✓ O potencial citotóxico da melitina, por meio do ensaio do MTT em células;
- ✓ O potencial genotóxico da melitina, por meio do ensaio do cometa em células;
- ✓ O potencial mutagênico da melitina, por meio do teste do micronúcleo em células;
- ✓ O potencial da melitina induzir estresse oxidativo em células.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Material Biológico

Para a realização dos testes biológicos, foram utilizadas células da linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humano), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em cultura no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro.

#### 3.2 Bioensaios com células HepG2 (Hepatocarcinoma Humano)

As células HepG2 foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 5 mL de meio MEM (Meio de Eagle – Gibco/Cultilab), suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab). Os frascos foram mantidos à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%), até que as células atingissem, aproximadamente, 80% de confluência. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem celular é de, aproximadamente, 24 horas.

#### 3.3 Material Químico

Foi utilizada melitina (CAS N° 37231-28-0, Sigma), um pequeno peptídeo (26 aminoácidos) de estrutura primária, com pureza de 91,8% (HPLC).

As concentrações iniciais utilizadas foram baseadas em estudos prévios realizados por Hoshina (2012), com veneno de abelha, e, posteriormente, pelo teste do MTT, levando-se em consideração a concentração da melitina no veneno (de 40 e 50% do volume total do veneno de *Apis mellífera*).

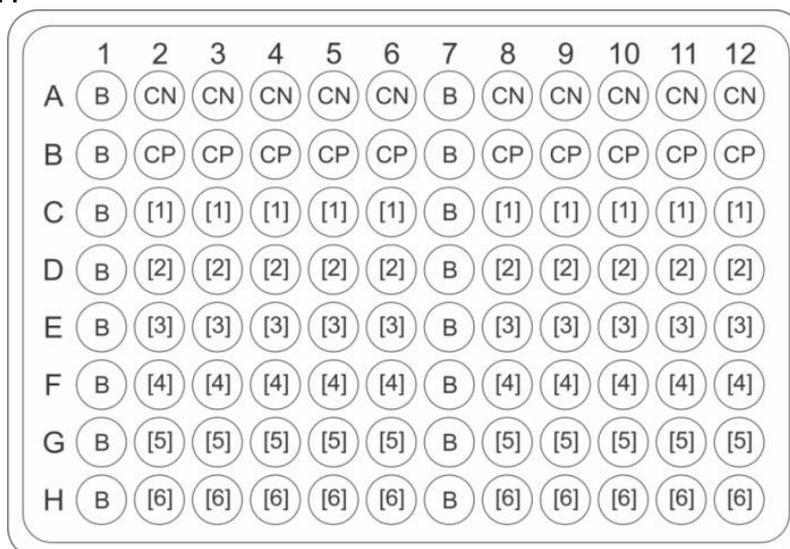
##### 3.3.1 Tratamentos

Para os ensaios de citotoxicidade (ensaio do MTT), foi utilizado como controle positivo (CP) Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro, na concentração de 1%. Já para os testes de genotoxicidade (ensaio do Cometa) e de mutagenicidade (teste do Micronúcleo), foi utilizado como CP o composto metilmetano sulfonato (MMS) à 4x10<sup>-2</sup> M e, como controle negativo (CN), meio de cultura sem soro.

### 3.4 Teste do MTT

Para a avaliação do potencial citotóxico da melitina, foi realizado o ensaio do MTT em células HepG2 o qual foi realizado em placas de ELISA de 96 poços, sendo os tratamentos dispostos na placa, de acordo com o esquema abaixo:

**Figura 1** – Distribuição dos tratamentos na placa de ELISA de 96 poços para o teste do MTT.



CN = controle negativo; CP = controle positivo; B = branco; [1], [2], [3], [4], [5], [6] = as seis diferentes concentrações da melitina. Fonte: Elaborada pela autora.

Para o ensaio do MTT (CAS N<sup>o</sup>. 298-93-1, Sigma), foram semeadas, em placas de 96 poços,  $2,34 \times 10^4$  células por poço, em um volume total de 100  $\mu$ L de meio com soro, onde foram incubadas por um período de 24 horas, para estabilização das células. Nos poços designados como B, não foram semeadas células e estes foram preenchidos somente com meio de cultura. Decorridas às 24 horas, o meio de cada poço foi substituído por um meio de cultura novo (sem soro), em um volume final de 200  $\mu$ L, sendo que nos poços designados para o controle negativo as células foram expostas somente ao meio de cultura sem soro e nos poços designados para o controle positivo as células foram expostas ao meio de cultura sem soro mais Triton X-100 1%. Nos demais poços, foram adicionadas as diferentes concentrações de melitina (50,0  $\mu$ g/mL, 25,0  $\mu$ g/mL, 10,0  $\mu$ g/mL, 5,0  $\mu$ g/mL, 1,0  $\mu$ g/mL, 0,5  $\mu$ g/mL, 0,05  $\mu$ g/mL, 0,005  $\mu$ g/mL, 0,0005  $\mu$ g/mL, 0,00005  $\mu$ g/mL e 0,000005  $\mu$ g/mL).

Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas e, posteriormente, estes foram retirados e substituídos por 150  $\mu$ L de MTT, diluído em

PBS, na concentração de  $1 \times 10^{-6}$  mg/mL. Depois de adicionado o MTT, a placa foi incubada por 4 horas, em estufa a 37 °C. Após este período, a solução de MTT foi descartada e adicionado, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca, em filtros de 540 nm (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific). Os valores de absorbância obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA/ Dunnet,  $p < 0,05$ .

### 3.5 Ensaio do Cometa

Para o ensaio do cometa, foram desenvolvidos, previamente, conforme citado acima, os ensaios do MTT e do Azul de Tripán. O ensaio do MTT foi desenvolvido para selecionar as concentrações não citotóxicas do agente a ser avaliado, para a linhagem celular utilizada, e o ensaio do Azul de Tripán para avaliar a viabilidade celular (superior à 80%) das concentrações não citotóxicas, previamente estabelecidas pelo MTT.

Para este ensaio, foram semeadas, em cada frasco de cultura,  $1 \times 10^5$  células. O tempo de tratamento utilizado foi de 24 horas e os testes realizados em triplicata, onde 3 frascos corresponderam ao controle negativo (CN); 3 frascos ao controle positivo (CP); e 9 frascos para testar a genotoxicidade das diferentes concentrações (5,0 µg/mL, 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,005 µg/mL, 0,0005 µg/mL) da amostra experimental.

Após passarem pelos tratamentos, as células HepG2 foram lavadas com PBS, submetidas à tripsina 5% por 5 minutos, ressuspendidas, homogeneizadas em 5 mL de meio de cultura com soro e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da coloração exclusiva com Azul de Tripán. Para a contagem das células viáveis, 10 µL da suspensão celular foram misturadas com 10 µL de Azul de Tripán. A análise, realizada pela análise de 100 células, considera células viáveis (vivas) as que apresentarem coloração branca e inviáveis (mortas) as que obtiverem coloração azul, uma vez que o corante é expulso das células vivas e permanece nas mortas. Este ensaio serviu como parâmetro para a realização do ensaio do cometa, que só deu continuidade para os tratamentos cuja viabilidade foi maior ou igual a 80%.

Após análise da viabilidade celular, uma alíquota de 20 µL de suspensão celular foi misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (37°C), a

0,5%, e, rapidamente, pingada sobre lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (60°C), a 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e resfriadas a uma temperatura de 4°C, por 20 minutos. Após a remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada e recém-preparada, contendo 89 mL de solução de lise estoque (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris com pH ajustado para 10, com auxílio de 8 g de NaOH, 890 mL de água destilada e 1% de lauril sarcosinato de sódio), 1 mL de Triton X-100 e 10 mL de DMSO, onde permaneceram por, no mínimo, 1 hora a 4°C. As lâminas foram posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (pH < 13) recém preparada (300 mM de NaOH/1mM EDTA, preparado de uma solução estoque contendo 10 N NaOH e 200 mM de EDTA, pH 10), onde permaneceram por 20 minutos antes da eletroforese, para desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a 4°C por 20 minutos a uma corrente de 0,8 V/cm e 300 mA. Seguindo-se a corrida, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M tris-HCl, pH = 7,5), em três séries de 5 minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol P.A., por 10 minutos. Após a fixação e secagem das lâminas, estas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1 M, e 45 mL de água destilada) e cobertas com lamínula.

O material foi imediatamente analisado em microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, em um aumento de 400 vezes. A dimensão dos danos indicados pelo teste do cometa foi avaliada pela análise de 100 nucleóides por lâmina, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente, totalizando 300 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados em cinco classes, de acordo com o tamanho das caudas e segundo a classificação de Collins, (2004) em: classe 0 - ausência de danos no DNA; classe 1 – pequeno dano; classe 2 – dano médio; classe 3 – grande dano; classe 4 – todo o DNA localizado apenas na cauda. Os escores foram obtidos pela multiplicação do número de células encontradas em cada classe pelo número da classe correspondente, com valores variando de 0 (ausência total de danos) a 400 (dano máximo causado).

Os valores de score obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA/Dunnet,  $p < 0,05$ .

### 3.6 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese

Após o ensaio do MTT, foram testadas três concentrações consideradas não citotóxicas para a linhagem celular, a fim de se avaliar sua capacidade de induzir mutagenicidade nas células.

Para o ensaio do micronúcleo (MN), foram semeadas, em cada frasco de cultura,  $1 \times 10^6$  células. O ensaio foi realizado em triplicata, onde 3 frascos corresponderam ao CN; 3 ao CP; 9 frascos para testar a mutagenicidade das diferentes concentrações de cada amostra experimental, sendo que os tratamentos permaneceram nos frascos por um período de 24 horas. Depois de realizados os tratamentos, o meio de cultura foi trocado e foram adicionados 50  $\mu$ L de citocalasina B (300  $\mu$ g/mL), por 28 horas, para obtenção de células binucleadas. Após a colheita, as células foram tratadas com solução hipotônica (KCl 0,075 M) e duas gotas de formol 40%, sendo posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionada ao pellet a solução fixadora de Carnoy (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial).

Antes da confecção das lâminas, estas foram lavadas e mantidas em água destilada a 4°C. Em seguida, a suspensão celular foi gotejada sobre lâminas contendo um filme de água e, depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos. Foram contadas 2.000 células binucleadas por réplica, totalizando 6.000 células por tratamento para a linhagem HepG2. As células contabilizadas apresentavam membranas nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e um mesmo padrão e intensidade de coloração.

Os valores obtidos das análises foram submetidos ao teste estatístico ANOVA/Dunnet,  $p < 0,05$ .

### 3.7 Ensaio do Estresse Oxidativo

Neste ensaio, foram realizados os testes de peroxidação lipídica (TBARS) e mensuração da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST). Estes testes foram realizados em parceria com o Professor MSc. Acácio Antônio Pigoso, da Fundação Hermínio Ometto de Araras-SP, especialista nesse tipo de bioensaio.

Para os testes de avaliação de estresse oxidativo, foram realizadas triplicatas para cada tratamento, sendo que em cada frasco foi adicionada uma quantidade igual a  $3 \times 10^6$  células. Após o tempo de tratamento de 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado, sendo retirado o excesso de PBS. As células foram liberadas dos frascos com o auxílio de “scraper”, passadas para um tubo de centrifuga graduado e levado para sonicar. Foi utilizado o sonicador Sonics Vibra Cell VCX-130 PB, com frequência de 40% e tempo de 20 segundos, para cada mL de suspensão celular.

Os valores obtidos nos testes foram submetidos ao teste estatístico Mann-Whitney,  $p < 0,05$ .

### **3.7.1 Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada segundo o método de Marklund e Marklund (1974). Em um tubo de ensaio foram misturados 2 mL de TRIS-HCL 25mM em EDTA 20 mM e pH 8,5, 200  $\mu$ L de pirogalol 15 mM, 200  $\mu$ L da suspensão celular. Após 10 minutos da realização da mistura, tempo necessário para a ocorrência de reação, foram adicionados 200  $\mu$ L de HCl 1N, para a interrupção da reação. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em 440 nm.

### **3.7.2 Avaliação da atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da catalase (CAT) foi medida segundo o método de Aebi (1994). Em uma cubeta de quartzo foram misturados 200  $\mu$ L da suspensão celular e 2 mL de PBS 0,1 M (pH 7,4 à temperatura ambiente). A reação foi iniciada quando foi adicionado 50  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  – 10 volumes). A leitura foi feita durante 5 minutos. A velocidade da decomposição do  $H_2O_2$  foi medida, em espectrofotômetro, na absorbância de 240 nm.

### **3.7.3 Avaliação da atividade da Glutathione S-Transferase (GST)**

A atividade da GST foi avaliada seguindo o método de Habig et al. (1974). A mistura analisada consistiu de 2,7 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), 100  $\mu$ L de GSH 1 mM, 100  $\mu$ L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1mM como substrato e

100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular. O aumento na absorbância foi medido a 340 nm por 5 minutos, com 1 minuto de intervalo entre as leituras.

#### **3.7.4 Determinação dos níveis de espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

O nível de peroxidação lipídica foi avaliado segundo o protocolo de Buege e Aust (1978), com algumas modificações. Foi preparada uma mistura de 1 mL de suspensão celular (com  $3 \times 10^6$  células/mL) com um meio contendo TBA 1% (preparado em NaOH 50 mM), 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 M e 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  20%. Essa mistura reacional foi aquecida por 10 minutos em banho fervente. Posteriormente, a mistura foi resfriada e 3mL de n-butanol foram adicionados, para a extração do cromógeno. Em seguida, esta mistura foi centrifugada por 5 minutos a 1500rpm, para separar a fase orgânica (com cromógeno). A absorbância foi lida em 535nm. A concentração de substâncias reativas ao ácido TBARS foi calculada, baseando-se no valor de  $\epsilon_{532} = 153000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.8 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.01, desenvolvido pela empresa GraphPad Software, San Diego – Califórnia (EUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teste do MTT

O teste do MTT é aplicado para se avaliar viabilidade celular, uma vez que as células viáveis, pós tratamento com o MMT, destacam-se por apresentar a coloração roxa, enquanto as células mortas não se coram. Isto acontece porque apenas as células viáveis conseguem converter o sal MTT em formazan, substância esta que apresenta a cor roxa. Essa conversão ocorre na membrana interna da mitocôndria e, como o formazan é incapaz de atravessar a membrana celular, ele fica retido dentro das células vivas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Os resultados do ensaio do MTT, realizado com as concentrações proposta neste trabalho para a melitina, está apresentado na Tabela 1 e Figura 2.

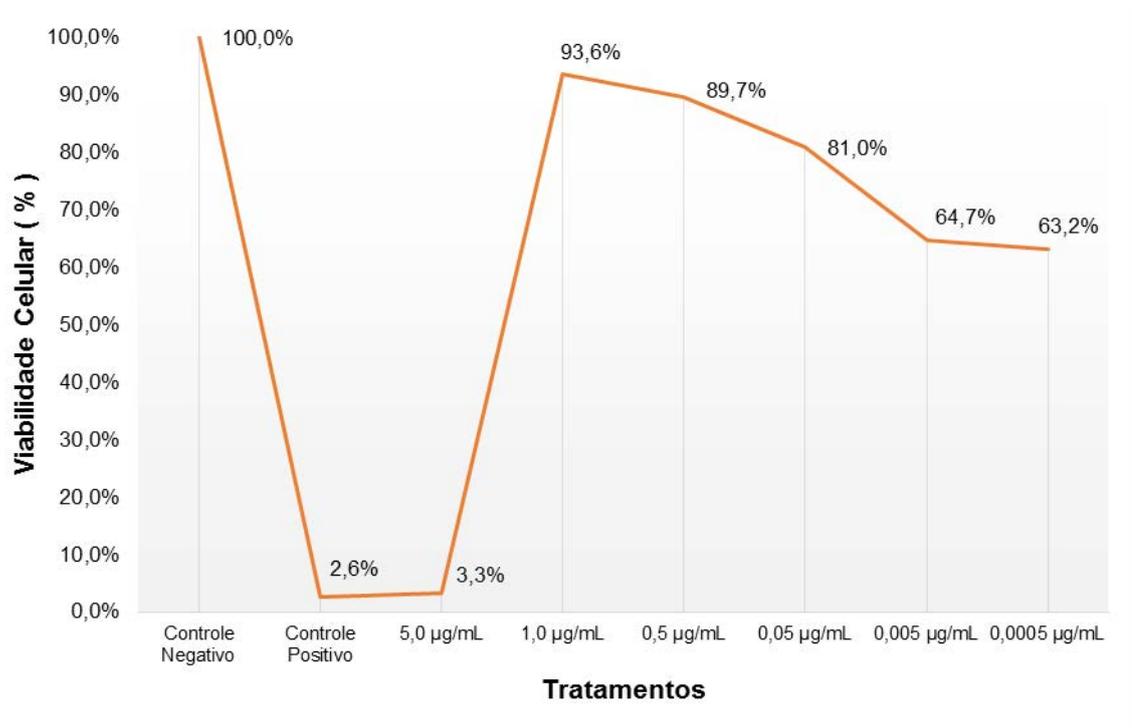
**Tabela 1** – Média de absorbância e viabilidade celular, referente ao ensaio colorimétrico do MTT, realizado em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina.

Tratamentos	Média Absorbância	Viabilidade % (Média ± DP)
Controle Negativo	1,925	100 ± 0,148
Controle Positivo	0,051	2,6 ± 0,001 *
5,0 µg/mL	0,064	3,3 ± 0,014 *
1,0 µg/mL	1,802	93,6 ± 0,079
0,5 µg/mL	1,726	89,7 ± 0,178
0,05 µg/mL	1,559	81,0 ± 0,181 *
0,005 µg/mL	1,245	64,7 ± 0,242 *
0,0005 µg/mL	1,217	63,2 ± 0,198 *

DP = Desvio padrão. \* = valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborada pela autora.

Pelos resultados obtidos, podemos observar que a concentração de 5,0 µg/mL foi estatisticamente diferente do CN e citotóxica para as células, tendo um valor bem próximo do obtido para o controle positivo. As concentrações de 0,005 µg/mL, 0,0005 µg/mL obtiveram uma viabilidade celular superior à da concentração de 5,0 e 1,0 µg/mL, porém ainda abaixo de 80%, sendo então, consideradas citotóxicas para as células. De acordo com os resultados obtidos neste teste, foram selecionadas as concentrações de 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,05 µg/mL, para a realização dos ensaio do cometa, micronúcleo e estresse oxidativo, por serem estas as únicas concentrações que apresentaram-se não tóxica para as células (viabilidade superior a 80%), apesar da concentração de 0,05 µg/mL ter um resultado estatisticamente diferente do controle negativo.

**Figura 2** – Viabilidade (%) obtida no teste do MTT das células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nossos resultados do ensaio do MTT estão em concordância com Adade et. al. (2013) para ambas as linhagens, onde estes autores verificaram que a melitina, na concentração de 1,0 µg/ml, não foi citotóxica para a linhagem celular LLC-MK<sub>2</sub> (célula de rim de *Macaca mulatta*), mas a concentração de 5,0 µg/ml já causou uma perda de 49% das células nas primeiras 24 horas de tratamento, chegando a 100% no segundo dia de incubação. Nesse mesmo estudo, eles também observaram que a melitina foi capaz de causar alterações na morfologia celular de *Trypanosoma cruzi*, que os autores caracterizaram como autofagia e apoptose, sendo a característica mais marcante desse efeito a presença de estruturas semelhantes à autofagossomos ao redor do retículo endoplasmático.

#### 4.2 Ensaio do Cometa

Como as concentrações com maiores viabilidades obtidas no ensaio do MTT foram 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,05 µg/mL, elas foram escolhidas para serem usadas no ensaio do cometa. Antes de se prosseguir com o ensaio, foi realizada a contagem de viabilidade celular, utilizando o método do Azul de Tripán, sendo que o ensaio do

cometa só poderia ocorrer se fossem obtidas viabilidade celulares acima de 80%. Os resultados de teste do Azul de Tripán podem ser observados na tabela 2.

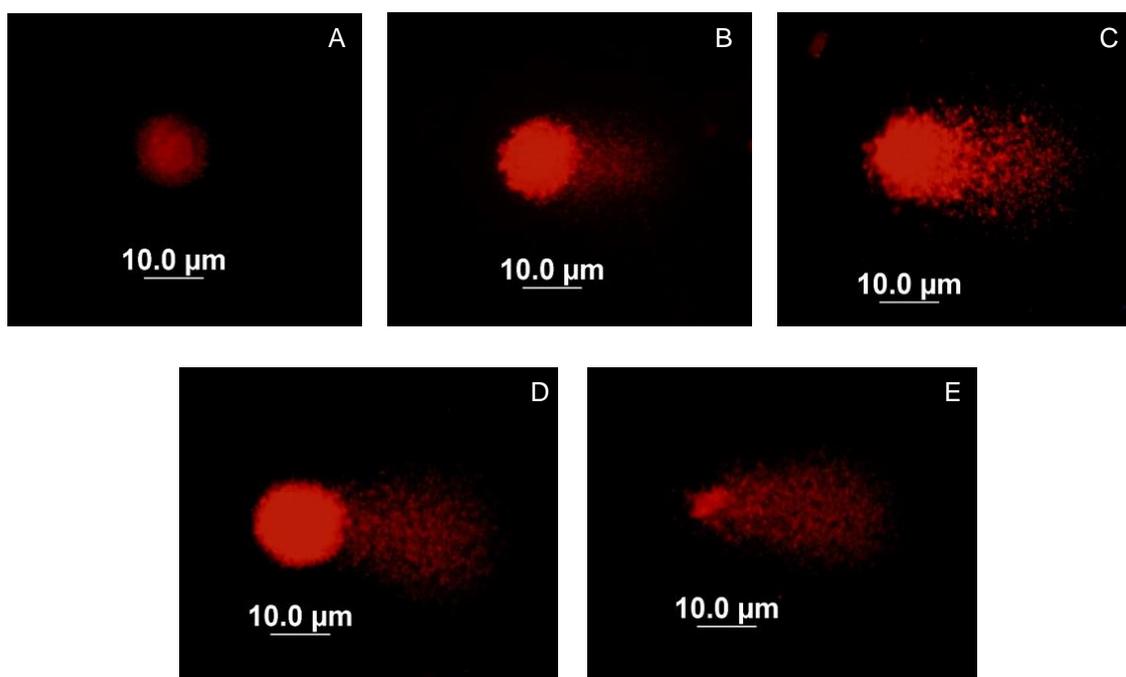
**Tabela 2** – Porcentagem da viabilidade células das células HepG2, obtida pelo teste de exclusão do corante azul de Tripán, após 24 horas de tratamento.

Tratamento	Frasco	Viabilidade (%)	Viabilidade celular % (Média±DP)
<b>Controle Negativo</b>	1	96	
	2	98	96,50 ± 1,32
	3	96	
4	96		
<b>Controle Positivo</b>	5	87	91,67 ± 4,51
	6	92	
	7	96	
<b>1,0 µg/mL</b>	8	94	96,33 ± 2,52
	9	99	
	10	97	
<b>0,5 µg/mL</b>	11	96	95,37 ± 2,12
	12	93	
	13	98	
<b>0,05 µg/mL</b>	14	96	97,33 ± 1,15
	15	98	

Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado na tabela 2, todos os valores de viabilidade atingiram mais de 80%, portanto confirmando os resultados do MTT, portanto adequados para dar continuidade ao ensaio do cometa,

Os nucleóides obtidos no teste do cometa foram classificados em cinco diferentes classes, segundo a classificação Collins (2004), onde a classe zero indica nenhum dano no DNA e classe 4 indica que, praticamente, todo o material genético se encontra na cauda do cometa (Figura 3).

**Figura 3** – Imagens do cometa de células HepG2 coradas com GelRed®.

Representação das classes de zero a quatro, segundo classificação de Collins (2004), onde A: classe zero; B: classe um; C: classe dois; D: classe três; E: classe quatro. Fonte: Elaborada pela autora.

Os escores obtidos no ensaio do cometa podem ser observado na Tabela 3

**Tabela 3** – Ensaio do cometa realizado com células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina.

Tratamentos	Número de células em cada classe do cometa					Escore de dano (Média ± DP)
	0	1	2	3	4	
CN	69,33± 6,35	14,33±6,43	7,33±2,89	5,33±1,53	3,67±1,53	59,67±15,13
CP	0,00±0,00	3,33±5,77	5,33±5,51	10,33±8,62	80,33±20,13	366,33±14,05 *
1,0 µg/mL	49,00±1,00	17,00±4,36	14,67±0,58	10,67±2,08	8,67±2,89	113,00±7,02
0,5 µg/mL	51,00±8,00	14,33±1,53	17,00±4,36	8,33±2,89	9,33±2,08	110,67±28,45
0,05 µg/mL	72,67±6,51	15,00±6,56	7,00±3,61	3,37±3,79	1,67±2,08	46,67±3,06

CN = Controle Negativo, CP = Controle Positivo e DP = Desvio padrão; \* = Valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os resultados obtidos pelo ensaio do cometa, é possível observar que nenhuma concentração obteve um valor estatisticamente significativo em relação ao controle negativo, o que permite concluir que nenhuma concentração teve efeito genotóxico nas células expostas.

A ausência de genotoxicidade pode ser explicada por 3 possíveis eventos: 1. o tempo em que as células HepG2 foram expostas ao composto (24 horas) foi insuficiente para induzir tal efeito sobre elas; 2. caso tenha havido indução de

genotoxicidade, as células, neste tempo de exposição, podem ter reparado os danos causados pela melitina; 3. a melitina, neste período de exposição, pode ter perdido a sua atividade e não ter induzido danos.

Em um estudo realizado por Maher e McClean (2008), os autores observaram que células de adenocarcinoma colorretal humano (HT29), tratadas com concentrações de 0,87 a 5,3  $\mu\text{M}$ , não tiveram seu DNA genômico fragmentado após 24 horas de exposição e nem em tempos de exposições mais curtos, como 4 e 7 horas.

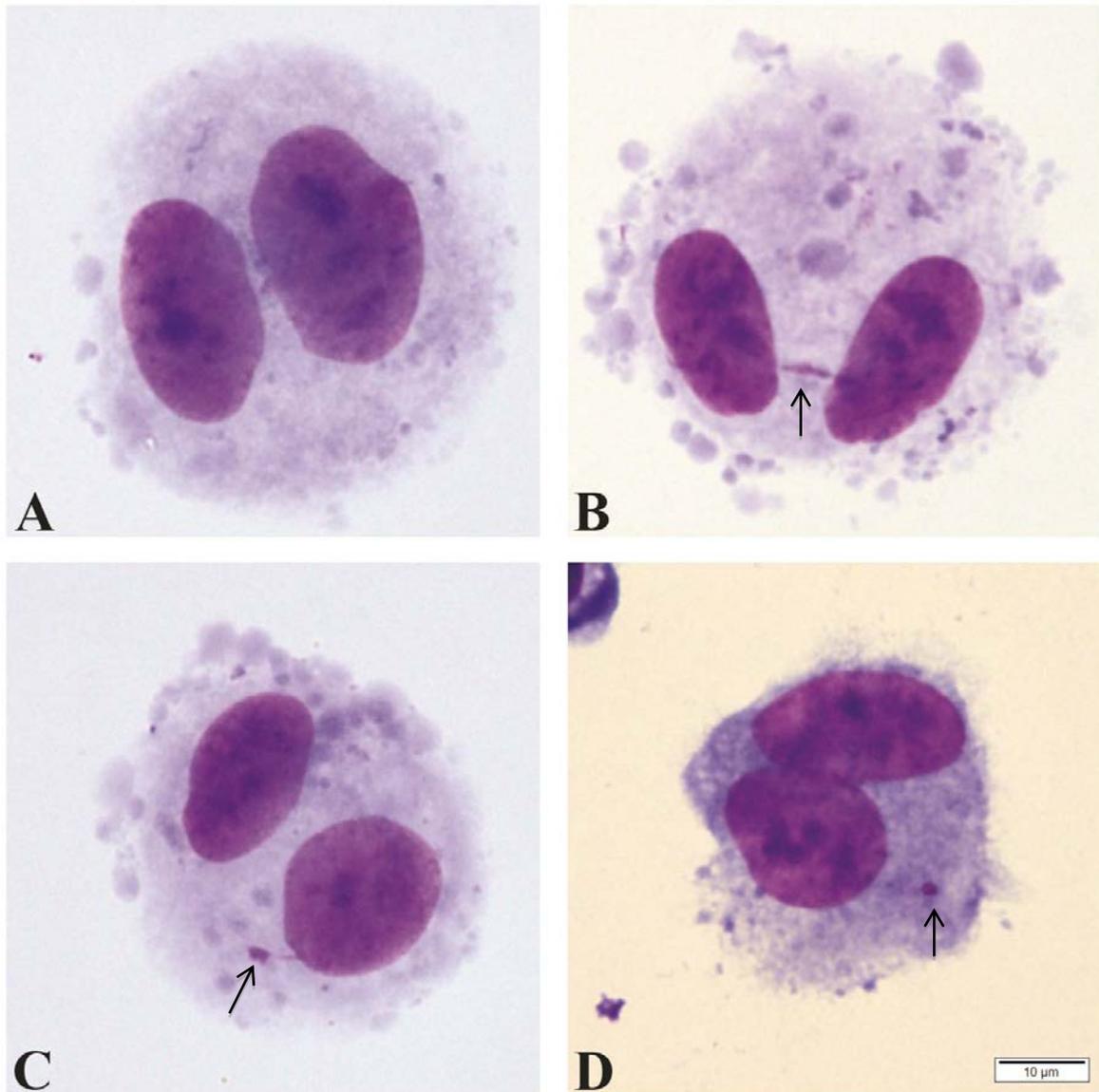
Segundo Brendler-Schwaab et al. (2005), os danos primários que podem ser causados no DNA podem ser reparados de forma rápida e, dessa forma, não serem detectados em ensaios que mensurem a genotoxicidade, como o ensaio do cometa. Para os autores, o tempo necessário de exposição para se capturar essas lesões primárias seria de 2 à 6 horas.

Porém, no estudo realizado por Galdiero et al. (2015) há evidências de que a melitina pode causar danos no DNA. Após a exposição de *Daphnia magna* por 48 horas à diferentes concentrações de melitina, observou-se valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo, indicando alta genotoxicidade. Porém, após 24 e 48 horas da remoção da *D. magna* do contato com a melitina, houve uma redução significativa dos efeitos genotóxicos, com resultados semelhantes aos observados para os testes com o controle negativo. Assim, o estudo sugere que a melitina pode causar danos celulares, porém esses danos podem ser reduzidos pelos mecanismos de reparo no DNA.

### **4.3 Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese**

No teste do Micronúcleo foram analisadas, após exposição de 24 horas às concentrações de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , 2.000 células por réplica, totalizando 6.000 células analisadas por tratamento. Neste ensaio, foram contabilizadas células binucleadas portadoras de micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas, conforme pode ser visualizado na Figura 4.

**Figura 4** – A. Célula binucleada normal; B. Célula binucleada com ponte nucleoplasmáticas; C. Células binucleada com broto, D. Célula binucleada com micronúcleo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, realizado com células HepG2 expostas a diferentes concentrações de melitina por 24 horas.

Tratamentos	MN (Média ± DP)	Broto (Média ± DP)	Ponte (Média ± DP)
Controle Negativo	29,00 ± 8,00	27,33 ± 12,66	9,67 ± 1,53
Controle Positivo	127,33 ± 34,93 *	64,00 ± 22,52 *	24,33 ± 2,31
1,0 µg/ml	75,76 ± 8,50 *	45,00 ± 11,79	27,33 ± 15,28
0,5 µg/ml	56,67 ± 20,13	47,00 ± 5,57	25,33 ± 10,60
0,05 µg/ml	46,33 ± 8,50	40,00 ± 9,85	27,00 ± 6,08

DP = Desvio padrão; \* = valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborada pela autora.

Com esses resultados, é possível observar que o tratamento com maior concentração de melitina teve um valor estatisticamente significativo em relação ao controle negativo, indicando que houve uma ação mutagênica sobre as células expostas à substância. Apesar das concentrações de 0,5 µg/mL e 0,05 µg/mL não apresentarem valores significativos para MN, é importante informar que houve um aumento na quantidade de micronúcleos, com relação aos encontrados no CN. Ainda é possível ressaltar a ocorrência de um aumento na quantidade de brotos e pontes encontrados em todos os tratamentos, apesar dos valores não se apresentarem estatisticamente significativo, em relação ao controle negativo.

Estudos sobre o efeito de veneno de abelha em células HepG2 expostas por 3 horas ao veneno de *Apis mellifera*, realizados por Hoshina (2012), mostraram que o veneno é capaz de causar efeitos genotóxicos e mutagênicos. A autora sugere que esta ação pode ser causada pela ação conjunta da melitina e da fosfolipase A<sub>2</sub> (enzima também presente no veneno da *Apis mellifera*), uma vez que ambas, segundo Oršolić (2012), são capazes de desestruturar a membrana das células.

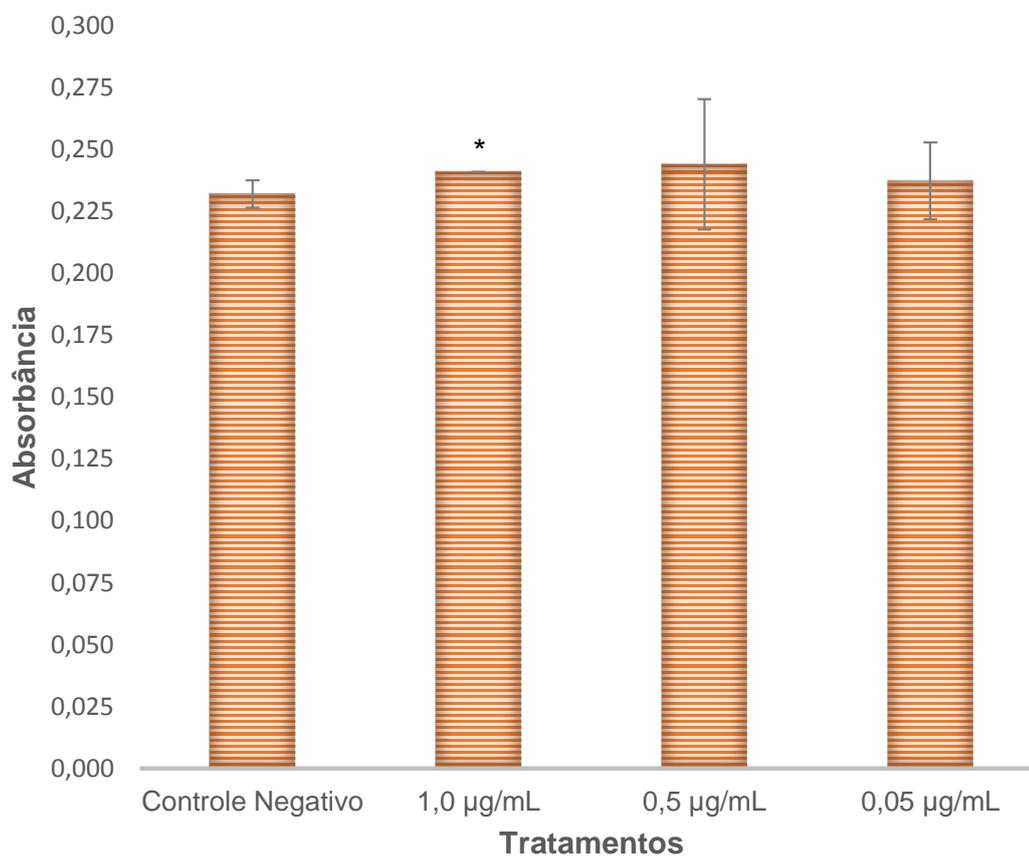
Assim, os resultados do presente estudo, foi possível observar que a concentração de 1,0 µg/ml induziu efeito mutagênico (MN) sobre as células, após exposição de 24 horas. Acredita-se que, como a linhagem HepG2 tem a capacidade de manter as funções de células normais de fígado (Knowles et al., 1980) e, com isso, possuir enzimas capazes de metabolizar compostos químicos, esse resultado pode ser devido à formação de metabólicos que causam danos no DNA, assim como observado no estudo realizado por Hoshina (2012). Porém, no presente estudo, a melitina não teve um efeito tão agressivo. Como os resultados de Hoshina (2012) foram obtidos com o veneno, o efeito pode ter sido induzido pela fosfolipase A<sub>2</sub> ou pela ação sinérgica da melitina e a fosfolipase A<sub>2</sub>.

## 4.4 Ensaios do Estresse Oxidativo

### 4.4.1 Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela oxidação do pirogalo, como proposto por Marklund e Marklund (1974). Os valores de absorbância obtidos podem ser observado na Figura 5. Apenas a concentração de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um valor estatisticamente significativo, em relação ao CN.

**Figura 5** – Valores da atividade da SOD por minuto obtidos para a linhagem HepG2, após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de melitina.



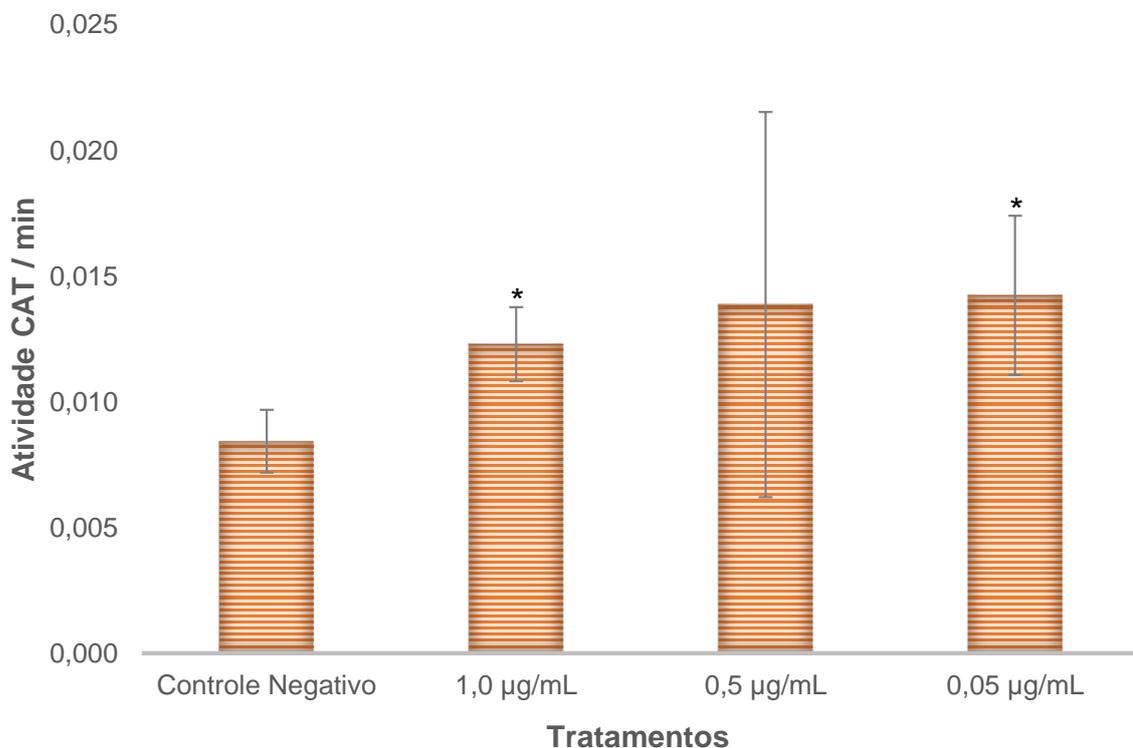
\* = Valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. (Mann-Whitney test,  $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborada pela autora.

Esse resultado sugere que houve um aumento nos radicais superóxido dentro das células e, conseqüentemente, um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase para transformar esse radical em  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio).

#### 4.4.2 Avaliação da atividade da Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase está representada na Figura 6. Pelos resultados obtidos, é possível observar que a melitina foi capaz de alterar a atividade da CAT nas concentrações de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  e 0,05  $\mu\text{g/mL}$ . Pelos resultados obtido podemos estimar que a substância estudada também seja capaz de alterar a atividade na CAT na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , pois, pelo teste estatístico utilizado não foi possível observar esta significância, devido ao alto desvio padrão obtido no teste. Ainda assim, é possível observar um aumento na atividade da CAT em todas as concentrações.

**Figura 6** – Valores da atividade da Catalase por minuto obtidos para a linhagem HepG2, após exposição a diferentes concentrações de melitina.



\* = Valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. (Mann-Whitney test,  $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborada pela autora.

Esse resultado está de acordo com Hoshina (2012), que constatou um aumento significativo na atividade da CAT para veneno de abelha puro. Como

consequência do aumento da atividade da SOD e aumento de seu produto (peróxido de hidrogênio), a atividade da catalase foi intensificada nas células de forma a reduzir o  $H_2O_2$  em água e oxigênio, evitando, assim, que esse composto causasse maiores danos a elas.

#### **4.4.3 Avaliação da atividade da Glutathione S-Transferase (GST)**

Segundo Hoshina (2012), o veneno bruto de abelha induziu um aumento na atividade da GST, que foi maior ao provocado, individualmente pela fosfolipase A2. Naquele trabalho, os autores sugeriram um efeito sinérgico entre a fosfolipase e a melitina. No presente estudo, porém, não houve variação da absorvância ao longo dos 5 minutos. Este resultado encontrado no presente trabalho pode ser devido à quantidade inadequada de células usadas no teste, a algum erro ocorrido no preparação dos reagentes (o CDNB é de difícil dissolução) ou, ainda, devido a GSH ser instável, o que exige que ela seja preparada apenas no momento da realização do teste e seja mantida em baixas temperaturas, durante toda a duração do experimento. Assim, os resultados desse teste foram considerados inconclusivos

#### **4.4.4 Determinação dos níveis de espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

A determinação de TBARS é usada como um índice da extensão da lipoperoxidação, causada pelo ataque de espécies reativas às membranas biológicas. O nível de peroxidação das membranas pode ser avaliado pela absorvância obtidas em cada amostra. A Tabela 5 mostra os valores de absorvância obtidos em cada triplicata da amostra.

**Tabela 5** – Valores de absorvância no teste do TBARS obtidos para a linhagem HepG2, após exposição por 24 horas a diferentes concentrações de melitina.

<b>Tratamento</b>	<b>Réplica</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>Controle Negativo</b>	1	0,026	0,018 ± 0,007
	2	0,016	
	3	0,013	
<b>1,0 µg/ml</b>	1	0,011	0,010 ± 0,001
	2	0,009	
	3	0,011	
<b>0,5 µg/ml</b>	1	0,007	0,014 ± 0,006
	2	0,017	
	3	0,018	
<b>0,05 µg/ml</b>	1	0,017	0,017 ± 0,001
	2	0,016	
	3	0,017	

DP = Desvio padrão. (Mann-Whitney test,  $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na tabela acima, os valores obtidos no controle negativo e nos tratamentos com diferentes concentrações de melitina estão próximos, sendo que um dos valores encontrado no controle negativo é maior que alguns valores encontrados nos tratamentos. Isso pode indicar que não houve peroxidação lipídica, porém, como observado em Hoshina (2012), células tratadas com o veneno de abelha obtiveram valores muito elevados ao comparar com o controle negativo. Resultado semelhante também foi observado em Han et al. (2002), onde os autores observaram que o veneno de abelha é capaz de produzir peróxidos lipídicos. Assim, pode-se considerar que os resultados obtidos nesse teste também são inconclusivos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos neste projeto, pode-se inferir que a melitina e seus metabólitos podem causar danos ao DNA das células ou até mesmo levar às células a morte, quando em altas concentrações. Apesar dos testes terem sido realizados somente com as células de hepatocarcinoma humano mantidas em cultura, foi possível observar que a concentração de 1,0 µg/mL, não pode ser considerado não citotóxica, pois esta induziu alguns danos, quando as células foram expostas à substância por apenas 24 horas, tempo insuficiente para promover danos celulares nesta concentração. Outro fato importante a ser considerado é a capacidade das maiores concentrações serem, capazes de induzir morte celular como observado no ensaio do MTT. Também pode ser observado que mesmo em concentrações menores, a melitina foi capaz de causar um aumento na atividade da enzima catalase, em resposta ao estresse oxidativo que elas sofreram.

Embora os produtos naturais, dentre eles os apícolas, estejam sendo bastante estudados, devido ao seu potencial farmacológico e anticarcinogênico, deve-se ter muita cautela na administração ou indicação dos mesmos em qualquer tipo de terapia, uma vez que concentrações baixas desses produtos já podem exibir citotoxicidade, como observado para a melitina sobre as células HepG2. Pelos resultados obtido nos testes de estresse oxidativo com células humanas (HepG2), para esta substância, podemos alertar que houve uma interferência da melitina na atividade de estabilização das membranas biológicas, o que pode se caracterizar em um efeito danoso para o organismo a ela exposto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADADE, C. M., OLIVEIRA, I. R. S., PAIS, J. A. R., SOUTO-PADRÓN, T. Milittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v.69, p.227-239, 2013.
- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- ARMSTRONG, D.; BROWNE, R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. **Free Radicals in Diagnostic Medicine**, v.366, p.43-58, 1994.
- ASSADY, M.; FARAHNAK, A.; GOLESTANI, A.; ESHARGHIAN, M. R. Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity assay in *Fasciola* spp. parasites and liver tissue extract. **Iranian Journal of Parasitology**, v.6, n.4, p.17-22, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002b.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6024**: informação e documentação: numeração progressiva as seções de um documento escrito: apresentação. Rio de Janeiro, 2003a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6028**: informação e documentação: resumo: apresentação. Rio de Janeiro, 2003b.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6027**: informação e documentação: sumário: apresentação. Rio de Janeiro, 2003c.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2011.
- BÖHMER, A.; JORDAN, J.; TSIKAS, D. High-performance liquid chromatography ultraviolet assay for human erythrocytic catalase activity by measuring glutathione as o-phthalaldehyde derivative. **Analytical Biochemistry**, v.410, p.296-303, 2011.
- BRENDLER-SCHWAAB, S., HARTMANN, A., PFUHLER, S., SPEIT, G. The *in vivo* comet assay use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v.20, p.245-254, 2005.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.
- CHASSEAUD, L. F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. **Advances in Cancer Research**, v.29, p. 175-274, 1979.

CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edge sword. **Progress in Neurobiology**, v.92, p.151-183, 2010.

CHEONG, H. S. J.; SETH, I.; JOINER, M. C.; TUCKER, J. D. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v.28, p.433-440, 2013.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.

CORROQUÉ, N. A. **Avaliação da toxicidade do azocorante acid red 114 antes e após processo de biodegração por meio de um consórcio de microrganismos**. 104f. – Universidade Estadual Paulista: Dissertação (Mestrado), Rio Claro – SP. 2014.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p. 246-255, 1999.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; MATINEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J. L.; GARDE, J. J. Comparison of TBARS Assay and BODIPY C<sub>11</sub> Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.360-368, 2010.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v.339, p.37-59, 1995.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.392, p.11-18, 1997.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios Journal**, 43 (172 – 173), p.233-246, 1985.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxic assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

GALDIERO, E. MASELLI, V., FALANGA, A. GESUELE, R., GALDIERO, S., FULGIONE, D., GUIDA, M. Integrated analysis of the ecotoxicological and genotoxic effects of the antimicrobial peptide melittin on *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environmental Pollution**, v.203, p.145-152, 2015.

GLÄTTLI, 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, p.255-267, 2006.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.7130–7139, 1974.

HAN, H. J.; PARK, S. H.; LEE, J. H.; YOON, B. C.; PARK, K. M.; MAR, W. C.; LEE, H. J.; KANG, S. K. Involvement of oxidative stress in bee venom-induced inhibition of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter in renal proximal tubule cells. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, p.564-568, 2002.

HAN, S.; LEE, K.; YEO, J.; K, W.; PARK. K. Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis mellifera*. L) venom. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v.64, p.e67-e72, 2011.

HARA, R. V. **Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, na região de influência da refinaria de Paulínia – SP**. 170f. Universidade Estadual Paulista: Dissertação (Mestrado). Rio Claro – SP. 2012.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. IRAG Working Group 4: Cell cytotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.79-126, 1997.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v.25, p.585-621, 1961.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da atividade antimutagênica de alguns produtos naturais de origem animal por meio de ensaios com célula HepG2**. 124f. – Universidade Estadual Paulista: Dissertação (Doutorado), Rio Claro – SP. 2012.

HOVHANNISYAN, G.G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular Cytogenetics**, v.17, p.1-11, 2010.

IRUDAYAM, S.; POBANDT, T.; BERKOWITZ, M. Free energy barrier for melittin reorientation from a membrane-bound state to a transmembrane state. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.117, p.13457-13463, 2013.

JACOBY, W. B. The glutathione S-transferase: a group of multifunctional detoxification proteins. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.43, p.383-414, 1977.

JAMASBI, E.; MULARSKI, A.; SEPAROVIC, F. Model membrane and cell studies of antimicrobial activity of melittin analogues. **Current Topics in Medical Chemistry**, v.16, p.40-45, 2016.

JOHANSSON, L. H.; BORG, L. A. H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissues samples. **Analytical Biochemistry**, v.174, p.331-336, 1988.

JUNIOR, R. S. F.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C., Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon**, v.56, p.355-362, 2010.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v.209, p.497-499, 1980.

LAMY, E.; KASSIE, F.; GMINSKI, R.; SCHMEISER, H. H.; MERSCH-SUNDERMANN, V. 3-Nitrobenzantrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. **Toxicology Letters**, v.146, p.103-109, 2004.

LEE, Y. J.; KANG, S. J.; KIM, B. M.; KIM, Y. J.; WOO, H. D.; CHUNG, H. W. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.169, p.189-197, 2007.

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

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v.47, p.469-474, 1974.

MOON, D., PARK, S., LEE, K., HEO, M., KIM, K. KIM, M., LEE, J., CHOI, Y. H., KIM, G. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v.7, p.1092-1101, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NAGAMI, H.; YOSHIMOTO, N.; UMAKOSHI, H.; SHIMANOUCI, T.; KUBOI, R. Liposome – Assisted activity of superoxide dismutase under oxidative stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, n.4, p.423-428, 2005.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A<sub>2</sub>s and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, p.167-181, 2000.

OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v.63, p.447-463, 2003.

OBE, G.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. Role of DNA double strand breaks in the formation of radiation induced chromosomal aberrations. **Progress in Mutation Research**, v.4, p.1-9, 1982.

- ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.31, p.173-194, 2012.
- PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I. V.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.490, p.209-214, 2001.
- PLAYER, T. J.; MILLS, D. J.; HORTON, A. A. Lipid peroxidation of the microsomal fraction and extracted, microsomal lipids from DAB-Induced hepatomas. **British Journal of Cancer**, v.39, p.773-778, 1979.
- QIAN, S.; HELLER, W. T. Melittin-induced cholesterol reorganization in lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1848, p.2253-2260, 2015.
- RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDAO, B. Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p.464-468, 2005.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, p.317-320, 2003.
- ROSS, D. C.; CRIM, J. W.; BROWN, M. R.; Herzog, G. A.; LEA, A. O. Toxic and antifeeding actions of melittin in the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie): Comparisons to bee venom and the insecticides chlorpyrifos and cyromazine. **Toxicon**, v.25, p. 307-313, 1987.
- ROUŠAR, T.; KUČERA, O.; LOTKOVÁ, H.; ČERVINKOVÁ, Z. Assessment of reduced glutathione: Comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. **Analytical Biochemistry**, v.423, p.236-240, 2012.
- SANDSTROM, J.; NILSSON, P.; KARLSSON, K.; MARKLUND, S. L. 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.19163-19166, 1994.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.
- SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H. S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v.115, p.246-270, 2007.
- STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v.114, p.785-796, 2012.

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

VICK, J. A.; SHIPMAN, W. H. Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. **Toxicon**, v.10, p.377-380, 1972.