

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/06/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* AO TRATAMENTO COM
MELITINA DO VENENO DE *APIS MELLIFERA* EM CÉLULAS
TRONCO TUMORAIS DE OSTEOSSARCOMA**

GIOVANA PEDRO

Botucatu, SP

Junho - 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* AO TRATAMENTO COM
MELITINA DO VENENO DE *APIS MELLIFERA* EM CÉLULAS
TRONCO TUMORAIS DE OSTEOSSARCOMA**

GIOVANA PEDRO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, FMVZ, UNESP, campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Renée Laufer Amorim

Botucatu, SP

Junho - 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pedro, Giovana.

Avaliação da resposta *in vitro* ao tratamento de Melitina do veneno de *Apis mellifera* em células tronco tumorais de osteossarcoma / Giovana Pedro. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Renée Laufer Amorim

Capes: 50503006

1. Oncologia veterinária. 2. Osteossarcoma. 3. Pesquisa médica translacional. 4. Naturopatia. 5. Meliteno. 6. Abelha-europeia.

Palavras-chave: Compostos naturais ; Medicina translacional; Oncologia comparada .

Impacto potencial desta pesquisa

Impacto científico esperado: Espera-se que os resultados encontrados neste estudo gerem novos conhecimentos sobre o potencial antitumoral da melitina, além de impulsionar novos estudos com esse composto que ainda é pouco explorado frente às suas diversas propriedades, não apenas **antitumorais**, mas também **antimicrobianas**, **antiparasitários**, **anti-inflamatórias** e **antifúngicas**.

Impacto social esperado: A busca por novos fármacos antitumorais visa sobretudo melhorar a sobrevida dos pacientes oncológicos, além de diminuir os efeitos colaterais dos quimioterápicos preconizados, atuando em associação ou isolados, com isso levando também a uma melhor qualidade de vida e bem estar nesse período crítico tanto dos pacientes humanos quanto em animais. Destaca-se ainda o menor potencial de contaminação ambiental e humana, pela menor manipulação de quimioterápicos, sabidamente tóxicos para o meio ambiente e pessoas.

Impacto econômico: O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de neoplasias, principalmente os derivados de plantas e venenos animais podem ser uma alternativa mais econômica, visto que alguns dos fármacos comercializados atualmente para este fim são de alto valor agregado. Com isso, o desenvolvimento a partir de compostos encontrados na natureza é uma ótima opção para otimizar os preços da produção desses medicamentos, além da possibilidade de gerar patentes sobre o desenvolvimento de fármacos.

Autor: Giovana Pedro

Título: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* AO TRATAMENTO COM MELITINA DO VENENO DE *APIS MELLIFERA* EM CÉLULAS TRONCO TUMORAIS DE OSTEOSARCOMA

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Renée Laufer Amorim

Presidente e orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - Unesp Botucatu

Profº Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - Unesp Botucatu

Profº Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

FZEA - USP

Data da defesa: 28 de Junho de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº do processo vinculado 2023/00973-0, pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço ao CEVAP pelo fornecimento da Melitina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Viabilidade celular, ensaio de MTT.....	24
Figura 2: Proliferação celular, ensaio de Wound Healing.....	25
Figura 3: Migração e invasão celular, ensaio de Transwell	26
Figura 4: Morte celular, ensaio de Anexina V/IP	26
Figura 5: Viabilidade de osteosferas, ensaio de MTT em cultivo 3D	27

RESUMO

O osteossarcoma (OSA) canino é uma neoplasia de origem mesenquimal responsável por cerca de 80% dos tumores primários ósseos malignos. O OSA possui alta agressividade local, levando à destruição óssea, além de grande capacidade metastática tanto regional, quanto à distância. Nos últimos anos, houve um aumento nos estudos de biotoxinas, como a melitina, um composto extraído de veneno da abelha *Apis mellifera* que já foi estudada e demonstrou significativa eficácia citotóxica em diferentes linhagens tumorais humanas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antitumoral da Melitina, em linhagens celulares de osteossarcoma canino, murino e humano *in vitro* em cultivo 2D e 3D. A melitina exerceu efeito citotóxico, apresentando uma IC₅₀ entre 1,5 e 2,5µg/ml. Inibiu a migração no teste de *Wound Healing*, além de impedir a migração e invasão celular no teste de *Transwell*, em doses a partir de 0,5µg/ml, apresentando morte celular por marcação de Iodeto de propídeo, nas três linhagens celulares. A melitina também apresentou citotoxicidade em modelo 3D de osteosferas, com uma IC₅₀ maior quando comparado ao cultivo 2D, ficando entre 3,5 e 4,0µg/ml. Com isso, concluímos que a melitina possui propriedades anti tumorais, além de diminuir a migração e invasão celular, em cultura de células de osteossarcoma de diferentes espécies. Este estudo abre novas perspectivas para o uso da melitina *in vivo* para o tratamento de osteossarcoma canino e humano.

Palavras-chave: Oncologia comparada. Compostos naturais. Medicina translacional.

ABSTRACT

Canine osteosarcoma (OSC) is a neoplasm of mesenchymal origin responsible for around 80% of primary malignant bone tumors. OSC has high local aggressiveness, leading to bone destruction, in addition to great metastatic capacity, both regionally and remotely. In recent years, there has been an increase in studies of biotoxins, such as tMelittin, a compound extracted from *Apis Mellifera* bee venom, has already been studied and demonstrated significant cytotoxic efficacy in different human tumor cell lines. This work aimed to evaluate the antitumor potential of Melitin in canine, murine, and human osteosarcoma cell lines *in vitro* in 2D and 3D cultures. Melittin exerted a cytotoxic effect, presenting an IC₅₀ between 1.5 and 2.5µg/ml. Inhibited migration in the Wound Healing test, in addition to preventing cell migration and invasion in the Transwell test, at doses starting from 0.5µg /ml, showing cell death by propidium iodide labeling, in all three cell lines. Melittin also showed cytotoxicity in a 3D model of osteospheres, with a higher IC₅₀ when compared to 2D culture, ranging between 3.5 and 4.0µg/ml. With this, we conclude that melittin has antitumor properties and reduces cell migration and invasion in cultures of osteosarcoma cells from different species. This study opens new perspectives for the use of melittin *in vivo* for the treatment of canine and human osteosarcoma.

Keywords: Comparative oncology. Natural compounds. Translational medicine.

SUMÁRIO

Impacto potencial desta pesquisa	3
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivos específicos	14
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2	18
TRABALHO CIENTÍFICO	18
CAPÍTULO 3	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	35

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve significativo aumento no número de diagnósticos de neoplasias, tanto em humanos quanto em animais, com isso ocorreu um crescimento na busca por modelos de estudos para oncologia comparada, como por exemplo, os modelos murinos. Apesar de serem de grande importância nos estudos de cascata metastáticas e efeitos adversos de quimioterápicos, eles apresentam limitações em diversos aspectos. Neste contexto vêm ganhando destaque os modelos caninos, que compartilham diversas características com os tumores humanos, como por exemplo, a ocorrência espontânea de diferentes tipos de neoplasias, metástases, resistência aos quimioterápicos, além de compartilharem características como prognóstico e sobrevida, tornando-os valiosos modelos no âmbito da oncologia comparada.

O osteossarcoma é uma neoplasia óssea agressiva, tanto em humanos quanto em cães, por apresentar altas taxas metastáticas, além de resistências às terapias convencionais, tendo um prognóstico reservado e diminuta sobrevida, e por compartilham as mesmas características com os osteossarcomas humanos, os cães se destacam como modelos nos estudos deste tipo de neoplasia. O prognóstico reservado dos osteossarcomas, decorrentes sobretudo das resistências às terapias convencionais, nos levam a busca por alternativas terapêuticas, especialmente de compostos naturais, tanto advindo de plantas, quanto de veneno de animais, como por exemplo o veneno de abelha, um composto biologicamente ativo composto predominantemente pela Melitina, um peptídeo com propriedades terapêuticas de interesse, como por exemplo sua propriedade antitumoral.

O crescente número de diagnósticos de neoplasias, como os osteossarcomas, que apresentam prognóstico reservado sobretudo devido a metástases e resistências às terapias convencionais, somado ao fato do cão ser um excelente modelo de estudo na oncologia comparada, aliado ao fato da melitina já ter apresentados propriedades tanto antitumorais quanto anti metastáticas, faz desse estudo promissor para a utilização da melitina futuramente na manipulação de possíveis fármacos antitumorais.

a proliferação de células SMMC-7721, linhagem de hepatoma humano. No estudo de Daniluk *et al.* (2020), a melitina inibiu a motilidade e invasão celular induzida por EGF (Fator de Crescimento Epidermal), das células MCF-7 e MDA-MB-231, ambas linhagens de tumor mamário humano.

Apesar dos múltiplos efeitos imunomoduladores da melitina, ela apresenta uma estreita faixa de segurança, onde a dose antitumoral também promove hemólise. Isso pode ser considerado um entrave no uso e distribuição da substância no organismo, com desafios na realização de ensaios clínicos. Visando sanar esse entrave no uso clínico, sistemas nanotecnológicos de distribuição da melitina estão sendo amplamente utilizados. Os principais exemplos são os testes com carreadores lipídicos (como nanopartículas lipídicas, discos lipídicos, nanopartículas conjugadas - lipídios e lipossomas), carreadores inorgânicos (nanopartículas de perfluorocarbono e pontos quânticos) e carreadores poliméricos (nanopartículas de β -ciclodextrina e nanopartículas PLGA) que reduzem a toxicidade da melitina e oferecem a possibilidade de direcioná-la para os locais intencionados (DANILUK *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2020).

O aumento da incidência de neoplasias nas espécies humana e canina, quer sejam pelas influências ambientais, genéticas ou epigenéticas, aliadas a resposta não adequada de alguns pacientes às atuais terapias em promover a remissão do quadro e garantir qualidade de vida com menores efeitos colaterais, a busca por alternativas deve ser estudada (LYU *et al.*, 2019). Nesse contexto, a melitina ganha destaque, já sendo evidenciada como uma substância de potenciais efeitos antitumorais, e especialmente anti-metastáticos, em diversos modelos *in vitro* de neoplasias humana. Até onde sabemos, ainda não existem pesquisas similares em modelos *in vitro* canino que atualmente é um dos mais importantes modelos de oncologia comparada e translacional.

REFERÊNCIAS

BECK, J.; REN, L.; HUANG, S.; BERGER, E.; BARDALES, K.; MANNHEIMER, J.; MAZCKO, C.; LEBLANC, A. Canine and murine models of osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 59, n. 3, p. 399-414, 2022.

BELAYNEH, R.; FOURMAN, M. S.; BHOGAL, S.; WEISS, K. R. Update on osteosarcoma. **Current Oncology Reports**, Philadelphia, v. 23, n. 6, p. 71, 2021.

DALECK, C. R.; FONSECA, C. S.; CANOLA, J. C. Osteossarcoma canino: revisão. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 233-242, 2002.

DALECK, C. R.; REPETTI, C. S. F.; MINTO, B. W.; COSTA NETO, J. M. Tumores ósseos. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B. (ed.). **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 571-584.

EHRHART, N. P.; RYAN, S. D.; FAN, T. M. Tumors of the skeletal system. In: WITHROW, S.; VAIL, D.; PAGE, R. (ed.). **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 6th ed. Saint Louis: Saunders, 2019. p 524-549.

FAN, T.M.; KHANNA, C. Comparative Aspects of Osteosarcoma Pathogenesis in Humans and Dogs. **Veterinary Sciences**. 2015; 2(3):210-230.
<https://doi.org/10.3390/vetsci2030210>

FENGER, J.M.; LONDON, C.A.; KISSEBERTH, W.C. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. **ILAR J**. 2014;55(1):69-85.
doi: 10.1093/ilar/ilu009

HILLERS, K. R.; DERNELL, W. S.; LAFFERTY, M. H.; WITHROW, S. J.; LANA, S. E. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 226, n. 8, p. 1364-1367, 2005.

IWAYA, K.; OGAWA, H.; KURODA, M.; IZUMI, M.; ISHIDA, T.; MUKAI, K.

Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, Dordrecht, v. 20, n. 6, p. 525-529, 2003.

JEONG, Y. J.; CHOI, Y.; SHIN, J. M.; CHO, H. J.; KANG, J. H.; PARK, K. K.; CHOE, J. Y.; BAE, Y. S.; HAN, S. M.; KIM, C. H.; CHANG, H. W.; CHANG, Y. C. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 68, p. 218-225, 2014.

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 effect 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**, New York, v. 258, n. 1, p. 72-81, 2012.

LI, B.; GU, W.; ZHANG, C.; HUANG, X. Q.; HAN, K. Q.; LING, C. Q. Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 induced by melittin. **Onkologie**, Basel, v. 29, n. 8-9, p. 367-371, 2006.

LYU, C.; FANG, F.; LI, B. Anti-tumor effects of melittin and its potential applications in clinic. **Current Protein and Peptide Science**, Sharjah, v. 20, n. 3, p. 240-250, 2019.

MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M. Anti-fungal properties and mechanisms of melittin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 104, n. 15, p. 6513-6526, 2020.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

SANDOVAL, M.; HARRIS, L. Cancer stem cells. **Oncology**, Cranbury, v. 28, n. 12, p. 1110-1111, 2014.

SILVA, J.A.M.; MARCHIORI, E.; MACEDO, F.C.; SILVA, P.R.G.D.; AMORIM, V.B. Pulmonary metastasis of osteosarcoma: multiple presentations in a single

patient. **J Bras Pneumol**, São Paulo, v. 48, n. 2, 2022.

SILVA, J.; MONGE-FUENTES, V.; GOMES, F.; LOPES, K.; ANJOS, L. D.; CAMPOS, G.; ARENAS, C.; BIOLCHI, A.; GONÇALVES, J.; GALANTE, P.; CAMPOS, L.; MORTARI, M. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. **Toxins**, Basel, v. 7, n. 8, p. 3179-3209, 2015.

YU, X.; DAI, Y.; ZHAO, Y.; QI, S.; LIU, L.; LU, L.; LUO, Q.; ZHANG, Z. Melittin-lipid nanoparticles target to lymph nodes and elicit a systemic anti-tumor immune response. **Nature Communications**, London, v. 11, n. 1, p. 1110, 2020.

YU, T.; CAI, Z.; CHANG, X.; XING, C.; WHITE, S.; GUO, X.; JIN, J. Research Progress of Nanomaterials in Chemotherapy of Osteosarcoma. **Orthop Surg**, China, v. 15 n. 9 p. 2244-2259, 2023

ZHU, H. G.; TAYEH, I.; ISRAEL, L.; CASTAGNA, M. Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation. **Journal of Biological Regulators Homeostatic Agents**, Milano, v. 5, n. 2, p. 52-58, 1991.

ZHU, H.; CHEN, D.; XIE, X.; LI, Y.; FAN, T. Melittin inhibits lung metastasis of human osteosarcoma: evidence of wnt/ β -catenin signaling pathway participation. **Toxicon Official Journal of the International Society on Toxicology**, Oxford, v. 198, p. 132-142, 2021.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo pudemos confirmar as hipóteses do potencial antitumoral da melitina, estando de acordo com diversos estudos realizados anteriormente. Além do potencial citotóxico a melitina exibiu potencial antiproliferativo e anti-invasivo que é de grande importância no contexto das neoplasias, principalmente o osteossarcoma, devido a suas altas taxas metastáticas.

Pesquisas como essa abrem caminho para a busca de novos compostos que possam ser utilizados no tratamento do câncer, que apesar dos avanços nas pesquisas ainda continua sendo uma doença devastadora, esperamos que novas pesquisas sejam realizadas, de maneira mais aprofundada, para que os mecanismos de ação sejam elucidados, estudos *in vivo* possam ser realizados com a utilização de nanocarreadores, utilizando das diversas tecnologias já disponíveis atualmente.

Com isso, que possamos caminhar rumo a melhores tratamentos, com menores efeitos colaterais, melhor qualidade e maior tempo de sobrevida para os pacientes oncológicos, tanto humanos quanto os animais de companhia, que ainda sofrem as consequências dos tratamentos atuais, frente a diversos tipos de neoplasias pouco responsivas.