
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DE ALGUNS
PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM ANIMAL POR MEIO DE
ENSAIOS COM CÉLULAS HepG2**

MÁRCIA MIYUKI HOSHINA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DE ALGUNS
PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM ANIMAL POR MEIO DE
ENSAIOS COM CÉLULAS HepG2**

MÁRCIA MIYUKI HOSHINA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas, área de
Biologia Celular e Molecular.

**Rio Claro – SP
2012**

*Dedico este trabalho às minhas fontes de inspiração:
meus pais Yukio e Yolanda (sempre presentes),
meu irmãozinho Hélio
e meu noivo Flávio.*

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim, esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, aquieta e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da alegria. E ainda mais no meio da tristeza. Todo o caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”.

João Guimarães Rosa em “Grande Sertão Veredas”

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Yukio e Yolanda (sempre presentes) que sempre me incentivaram a sempre me superar, gostaria de agradecer também por me ensinarem valores que foram fundamentais para a construção do meu caráter e conseqüentemente da pessoa que sou hoje. Apesar de termos nos separado tão cedo e de a saudade ser tão grande, acredito que, onde quer que estejam, devam estar muito felizes e orgulhosos de como trilhei meu caminho, conquistando muitas vitórias, superando obstáculos e dificuldades, sempre tentando ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu irmãozinho Hélio que sempre me apoiou, não somente nesta jornada, mas em toda a minha vida. Obrigada pelos conselhos e sessões de terapia gratuitas, por enxugar minhas lágrimas e me fazer rir, pela cumplicidade e amizade, pelo ombro amigo, por me ajudar a superar todos os obstáculos e dificuldades, por entender minhas ausências em casa por causa do doutorado, por ter paciência comigo nos meus momentos de loucura e estresse, enfim, por ser esta pessoa maravilhosa que tenho o prazer e orgulho de ter como irmão.

Ao meu noivo Flávio por todo o companheirismo e cumplicidade, por me aguentar nos meus piores momentos e mesmo assim não desistir de mim, por sempre me fazer feliz, por compreender o meu ritmo louco de trabalho, por me escutar, por não me deixar desistir, por me incentivar em todas as minhas decisões, por me fazer acreditar em meu potencial, por ser meu complemento, por me deixar fazer parte da sua vida (de novo) e querer construir uma vida junto comigo.

À minha tia Alcídia e primos Celi e Celso por sempre torcerem por mim e me darem apoio.

À família Grassi (André, Eliete, Andréia, Ana, Márcio e João Pedro) pelo apoio, pelo convívio e por me aceitarem nesta família.

À minha orientadora Marin, ou melhor, Mãerin, que aceitou me orientar durante estes quatro anos, por me aguentar e puxar minha orelha quando necessário, por acreditar em mim e no meu trabalho, por muitas vezes me adotar e me aconselhar

como mãe, pela amizade, por não ser somente minha orientadora, mas minha amiga, conselheira e mãe postiça.

À Raquel (karma 1, tudo bem a gente tem que pagar certos pecados...) que se tornou uma grande amiga e uma pessoa que considero indispensável em minha vida, agradeço pela ajuda nas análises e nos experimentos, pelos toques e dicas no trabalho, pelas viagens, pelo companheirismo, pelas “pérolas”, por não me deixar em paz, por escutar meus desabaços e frustrações, por dividir momentos muito importantes comigo, enfim por tornar os meus dias no laboratório mais engraçados e felizes.

À Maria Tereza (karma 2, ai ai ai, o que que eu fiz de tão errado!?) que também se tornou minha grande amiga, pelas longas horas de análise no laboratório, por me ajudar nos experimentos, por sempre dar deixas para podermos tirar sarro da sua cara, pelo seu companheirismo e cumplicidade, pelos desabaços e “bafos”.

Ao “grupo” Matheus por todas as discussões acadêmicas, por sempre me forçar a pensar além, pelas discussões e ajudas durante o doutorado, pela grande amizade.

Às minhas amigas: Dani e Jaque que me ensinaram tudo sobre cultura de células, pela paciência em me ensinar e me treinar; Bruna (amiga de longa data que eu tive a grande felicidade de conviver novamente) por sempre estar disposta a ajudar e dar ótimos conselhos, agradeço a vocês meninas por toda a ajuda, ensinamentos, conversas, conselhos, desabaços, confidências e risadas.

As minhas “irmãzinhas” Cris (pelas baladas, papos cabeça sobre a vida e assuntos aleatórios), Laís (princesa), Michele e Nádia pela companhia e momentos de descontração e por me fazerem sentir jovem.

Às minhas companheiras de “estresse” Bruna, Jaque Diego (mais nova integrante do maior grupo do mundo de antimutagênese), Michele e Raquel por me fazerem companhia nas “jornadas” durante o aprendizado da técnica de estresse oxidativo.

Ao casal Dânia e Du pela amizade, pelos ótimos momentos de descontração (dentro e fora do laboratório) e pela ajuda nos experimentos e contagem de viabilidade (né, Du?).

Aos companheiros da maratona cometa (Matheus, Raquel, Maria, Dânia, Léo, Cris, Nádia, Laís, Michele) pelas comilanças e por fazerem a técnica do cometa menos chata.

A todos os meus amigos que de uma forma ou outra ajudaram no desenvolvimento deste trabalho ou na manutenção da minha sanidade mental, mas gostaria de agradecer especialmente: Mari, Rê Carmona, Milene, Shurato, Morango, Tati, Milena, Davi, Elciôr, Fafá, Marião, Fer B, Luciene, Cris Miléo, Livia, Jorge, Silvana, Gleí, Rafa (Azul).

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental e do departamento pelo convívio.

À Sandra Veloso pelo convívio e auxílio no projeto.

À Roberta Kleiner pelas maluquices e por toda ajuda no preparo das soluções e materiais para os meus experimentos.

Ao Antonio Sérgio Pascon pela coleta dos ninhos de vespa utilizados no meu projeto.

Ao professor Dr. Mario Sérgio Palma por me deixar utilizar os equipamentos e o Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica.

À Dra. Lucilene Delazari dos Santos por me auxiliar no delineamento do projeto e me auxiliar na obtenção do veneno de vespa.

Ao professor Acácio Antonio Pigoso pelo auxílio na técnica do estresse oxidativo, pela paciência e prontidão em me ensinar a técnica e discutir os resultados.

Ao professor Dr. Osmar Malaspina pelo veneno de abelha.

À professora Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti (puxa nome difícil de escrever) pela amizade.

A todos os professores do Departamento de Biologia.

Ao Beto e Anally pela ajuda com as vespas, por me ensinar a extrair o veneno e por toda a paciência e disponibilidade em me ajudar.

À Ana Caviqioli por toda a ajuda com os aparelhos do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica.

À CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço também a todas as vespas e abelhas que foram sacrificadas para a realização deste trabalho, sem elas este trabalho não seria possível.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

Resumo

A exposição do homem às substâncias danosas, sejam estas substâncias de origem natural ou sintética, vem crescendo durante as últimas décadas. Esta exposição é capaz de induzir diversos efeitos deletérios nos organismos expostos, provocando diversas doenças e até mesmo a morte. Da mesma forma que aumenta a quantidade de substâncias promotoras de impactos ambientais, também crescem as pesquisas que buscam por novas substâncias que sejam capazes de proteger os organismos destes efeitos deletérios. Esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica, genotóxica e antígenotóxica, mutagênica e antimutagênica de venenos de Hymenoptera (especificamente da abelha *Apis mellifera* e da vespa *Polybia paulista*), em diferentes concentrações, utilizando para essa avaliação o sistema teste de HepG2. Foi utilizado o ensaio do MTT para se avaliar a citotoxicidade tanto do veneno de *A. mellifera* como de *P. paulista*. As concentrações consideradas não citotóxicas (1, 5 e 10 µg/mL de veneno de vespa e 0,1, 0,05 e 0,01 µg/mL do veneno de abelha) foram utilizadas para se avaliar o potencial genotóxico (ensaio do cometa) e mutagênico (teste do micronúcleo). Estas concentrações não citotóxicas mostraram-se genotóxicas e mutagênicas para o sistema teste utilizado. Foram utilizadas outras concentrações, mais baixas que as utilizadas nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade (1 ng/mL, 100 pg/mL e 10 pg/mL de veneno de vespa e 10 pg/mL, 1 pg/mL e 0,1 pg/mL para o veneno de abelha), para a realização dos testes de antígenotoxicidade e antimutagenicidade com células HepG2. As concentrações utilizadas nesses ensaios mostraram que ambos os venenos, ao invés de inibirem e/ou diminuírem o efeito genotóxico e mutagênico da substância metilmetano sulfonato, aumentaram ainda mais os danos causados por esta substância. Para se verificar qual seria o composto responsável pelos efeitos registrados para os venenos, foi também avaliado o efeito da fosfolipase A₂ (PLA₂ de *A. mellifera*), que é uma substância presente em ambos os venenos. Foram testadas nos ensaios do cometa, do micronúcleo e de estresse oxidativo, a concentração de 0,1 µg/mL dos venenos de vespa e de abelha e a concentração de 10 ng/mL de PLA₂, que corresponde a 10% do peso seco dos venenos. Observou-se que a PLA₂ é capaz de induzir genotoxicidade e mutagenicidade, assim como causar peroxidação lipídica, além de alterar as atividades das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GST). Desse modo a genotoxicidade observada para a PLA₂ é causada pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que interagem com as

membranas biológicas e com o DNA das células expostas. A genotoxicidade e mutagenicidade observada para o veneno de *P. paulista* deve ser causado pela ação da PLA₂, enquanto que para o veneno de *A.mellifera* parece ser devido a um efeito aditivo entre a PLA₂ e a melitina (composto mais abundante do veneno deste inseto).

Palavras-chave: *Polybia paulista*, *Apis mellifera*, fosfolipase A2, ensaio do MTT, ensaio do cometa, teste do micronúcleo.

Abstract

Human exposure to harmful substances, natural or synthetic, is increasing in the last decades. This exposure is able to induce several deleterious effects on the exposed organisms, causing several diseases and even death. As the amount of substances that promote environmental impacts increases, researches seeking for new substances that are able to protect the organisms against these deleterious effects have also increased. This study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic, mutagenic and antimutagenic of Hymenoptera venoms (specifically of the bee *Apis mellifera* and the wasp *Polybia paulista*), in different concentrations, using for this evaluation the HepG2 test system. The MTT assay was used to assess the cytotoxicity the venom of *A. mellifera* and *P. paulista*. The concentrations considered non cytotoxic (1, 5 and 10 μ g/mL of the wasp venom and 0.1, 0.05 and 0.01 μ g/mL of the bee venom) were used to evaluate the genotoxic (comet assay) and mutagenic potential (micronucleus test). These non cytotoxic concentrations were genotoxic for the test system used. Other concentrations were used, lower than the ones used in the genotoxicity and mutagenicity tests (1ng/mL, 100pg/mL and 10pg/mL of the wasp venom and 10pg/mL, 1pg/mL and 0,1pg/mL for the bee venom), in order to perform the antigenotoxicity and antimutagenicity tests with HepG2 cells. The concentrations used in these assays showed that both venoms, instead of inhibiting and/or decreasing the gentoxic and mutagenic effects of the substance methylmethane sulfonate, increased even more the damages caused by this substance. In order to verify which would be the compound responsible for the effects registered for the venoms, it was also evaluated the effect of phospholipase A₂ (PLA₂ from *A. mellifera*), which is a substance present in both venoms. The concentration of 0.1 μ g/mL of the wasp and bee venoms and the concentration of 10 ng/mL of PLA₂, which corresponds to 10% of the dry weight of the venoms were tested in the comet assay, micronucleus test and oxidative stress assay. It was observed that PLA₂ is capable of inducing genotoxicity and mutagenicity, as well as causing lipid peroxidation, besides altering the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GST). Thus, the genotoxicity observed for PLA₂ is caused by the formation of reactive oxygen species (ROS), which Interact with biological membranes and DNA of the exposed cells. The genotoxicity and mutagenicity observed for the *P. paulista* venom can be caused by the action of PLA₂, while the

effects observed for the *A. mellifera* venom seem to be due to an additive effect between PLA₂ and melittin (most abundant compound of this insect).

Key-words: *Polybia paulista*, *Apis mellifera*, phospholipase A2, MTT assay, comet assay, micronucleus test.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIU 87	célula de câncer de bexiga
Ca ²⁺	íon cálcio
CAT	Catalase
CBMN	Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese
Cit-B	Citocalasina B
CN	controle negativo
CO ₂	dióxido de carbono
CP	controle positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GABA	ácido gama-aminobutírico
GPX	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GST	glutathione S-transferase
HepG2	Célula de Carcinoma Hepatocelular Humano
HL-60	célula de leucemia promielocítica humana
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
LLC	células do carcinoma pulmonar de Lewis
mA	miliAmper
MDA	Malondialdeído
MEM	meio essencial mínimo
Mg ²⁺	íon magnésio
MMP	metaloproteinases da matriz
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NTB	nitro blue tetrazolium
ng	nanograma
nM	nanomolar
PBS	Solução fosfato salino
PC 3	célula de câncer de próstata
pH	Potencial hidrogeniônico
pg	picograma
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PMSF	Fluoreto de Sulfonil Metil Fenil
ROS	reactive oxygen species
RNS	espécies reativas de nitrogênio
SBF	soro bovino fetal
SOD	Superóxido Dismutase
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ ⁻	ânion superóxido
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
µg	micrograma
UV-Vis	Ultravioleta Visível
V	volt
VA	veneno de abelha
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VV	veneno de vespa

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	14
2. Objetivos	16
3. Revisão da Literatura	17
3.1. Antimutagênese	17
3.2. Veneno de Hymenoptera	18
3.3. Testes de citotoxicidade	20
3.4. Testes de antimutagenicidade	20
3.5. Teste de estresse oxidativo	22
4. Material e Métodos	25
4.1. Material	25
4.1.1. Substâncias testadas	25
4.1.2. Material Biológico	26
4.2. Métodos	26
4.2.1. Cultura de células HepG2	26
4.2.2. Ensaio do MTT	26
4.2.3. Ensaio do cometa.....	27
4.2.4. Teste do micronúcleo	30
4.2.5. Ensaio do estresse oxidativo.....	31
4.2.6. Análises estatísticas.....	33
5. Resultados	34
ARTIGO 1: Efeitos tóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos do veneno da vespa <i>Polybia paulista</i>	35
ARTIGO 2: Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de veneno de <i>Apis mellifera</i>	55
ARTIGO 3: Comparação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do veneno de vespa <i>Polybia paulista</i> , de abelha <i>Apis mellifera</i> e da fosfolipase A ₂	74
ARTIGO 4: Estresse oxidativo induzido por veneno da vespa <i>Polybia paulista</i> , da abelha <i>Apis mellifera</i> e da fosfolipase A ₂	92
6. Conclusão geral	106
7. Referências Bibliográficas	108

1. Introdução Geral

Atualmente, o homem está exposto a uma infinidade de substâncias, sejam elas naturais ou de origem antropogênica, capazes de induzir efeitos deletérios à saúde e podendo causar doenças como, por exemplo, o câncer. A cada dia, diversas novas substâncias são produzidas e lançadas no meio ambiente e essas podem ser capazes de causar danos aos seres vivos expostos. Diversos estudos apontam para o perigo da exposição de organismos vivos aos poluentes ambientais e à conseqüente possibilidade de indução de danos no seu material genético (HOSHINA et al., 2008, BIANCHI et al., 2011, LEME et al., 2012).

A exposição e o contato dos organismos a xenobiontes com potencialidade tóxica é hoje, praticamente, impossível de se evitar. Porém, uma forma eficiente e bastante promissora de se evitar que esses compostos causem algum risco à saúde seria a ingestão de substâncias capazes de proteger os organismos, como por exemplo, das chamadas substâncias antimutagênicas. Desse modo, as investigações que buscam por novas substâncias que tenham propriedades protetoras, principalmente as de origem natural, vêm recebendo grande atenção.

Dentre os produtos naturais, os de origem animal podem se caracterizar como importantes compostos no combate a ação deletéria de agentes nocivos. Neste contexto, o estudo de venenos animais, como substâncias com potencial farmacológico, vem sendo realizado há algum tempo, destacando-se entre eles os venenos de Hymenoptera.

A ordem Hymenoptera é composta por aproximadamente cem mil espécies de vespas, abelhas e formigas (SANTOS, 2007). As vespas pertencem ao grupo dos Hymenoptera Aculeata e estão divididas em três superfamílias: Bethyloidea, Sphecoida, e Vespoidea. A família Vespidae é uma subdivisão da superfamília Vespoidea, onde está a subfamília Polistinae (SANTOS, 2007), espécie apenas encontrada no Brasil. Nesta subfamília encontra-se a espécie *Polybia paulista*. As abelhas também pertencem ao grupo dos Hymenoptera Aculeata. A espécie *Apis mellifera* pertence à subfamília Apinae e família Apidae (BILÓ et al., 2005).

Venenos de Hymenoptera, principalmente de vespas e abelhas, são compostos por proteínas (algumas com atividade enzimática), peptídeos farmacologicamente ativos, histamina, acetilcolina, catecolamina e diversas outras substâncias (HOFFMAN, 2006). A principal função do veneno para o inseto é a proteção contra predadores e a defesa dos ninhos contra invasores. Os principais

efeitos dos venenos dos himenópteros são reações inflamatórias e/ou imunológicas nas vítimas das picadas (SANTOS, 2007). Apesar destes venenos apresentarem diversas substâncias que causam reações alérgicas, alguns estudos identificaram e isolaram substâncias presentes nestes compostos com potencial farmacológico. O veneno de abelha tem sido utilizado no tratamento de artrite, reumatismo, tumores e problemas de pele (LOKESHWARI; SHANTIBALA, 2010). Além disso, tem sido indicado como inibidor de angiogênese em tumores e metástase (HUH et al., 2010)

Venenos de vespas apresentam em sua composição peptídeos que são capazes de interagir com a membrana celular de bactérias, o que os credenciam como ótimos candidatos à novas substâncias bactericidas (ČEŘOVSKÝ et al., 2008). Estudos realizados por Cunha et. al (2005) revelaram que o veneno da vespa *P. ignobilis* possui compostos com potencial farmacológico para serem utilizados como droga anti-convulsivante. O veneno dessas vespas, segundo Wang et al. (2011), também apresentam alguns peptídeos com potencial anti-tumoral.

2. Objetivos

Frente ao exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e antigenotóxico, mutagênico e antimutagênico, bem como o potencial de indução de estresse oxidativo de venenos da vespa *P. paulista*, da abelha *A. mellifera*, bem como da fosfolipase A2, importante componente dos venenos dos himenópteros em estudo, por meio de diferentes ensaios biológicos, como:

- avaliação da citotoxicidade dos venenos brutos de vespa (*P. paulista*) e abelha (*A. mellifera*), por meio do ensaio do MTT;
- avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico, mutagênico e antimutagênico dos venenos brutos de abelha e vespa, por meio do ensaio do cometa e do teste do MN com bloqueio da citocinese em células HepG2;
- verificar se a fosfolipase A2 (um dos componentes dos venenos de vespa e abelha presente em maior quantidade) é responsável pelos resultados observados para os venenos brutos;
- avaliar o potencial oxidativo/antioxidativo das substâncias testadas, por meio do teste de estresse oxidativo em células HepG2;
- identificar, por meio dos diferentes testes, o mecanismo de ação das substâncias testadas (desmutagênese, bioantimutagênese).

3. Revisão da Literatura

3.1. Antimutagênese

O ser humano está constantemente exposto a diversas substâncias presentes no ambiente, sejam elas de origem natural ou sintética, entre as quais, as mais preocupantes são as com características mutagênicas e genotóxicas. A exposição dos organismos a estas substâncias pode induzir alterações na molécula de DNA, denominadas de mutações. As mutações estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças, entre elas as doenças neoplásicas. A prevenção do câncer e de outras doenças relacionadas pode ocorrer pela não exposição aos agentes mutagênicos e carcinogênicos ou pela proteção do material genético contra as mutações, conferida por algum agente químico. Nas condições atuais, é extremamente difícil não se expor a agentes mutagênicos e carcinogênicos, uma vez que esses agentes estão presentes no ambiente, por estarem intimamente relacionados às atividades humanas.

A quimioproteção pode ser promovida pelo fortalecimento dos próprios mecanismos fisiológicos de defesa do organismo ou pelo uso de medicamentos (De FLORA, 1988). Desta forma, a identificação de substâncias com potencialidade de proteger o DNA contra danos mutagênicos e genotóxicos (substâncias antimutagênicas) vem recebendo crescente e especial atenção. De acordo com Ferguson (1994), o consumo de substâncias com potencialidade antimutagênicas ou anticarcinogênicas seria a forma mais efetiva de prevenir os organismos contra o câncer ou as doenças genéticas.

O termo “antimutagênico” foi usado, originalmente, por Novick e Szilard (1952), para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo de ação envolvido. As substâncias que protegem o DNA contra danos podem ser classificadas em duas diferentes classes: substâncias com mecanismo desmutagênico e substâncias com mecanismo bioantimutagênico. Substâncias desmutagênicas são aquelas que promovem uma proteção ao DNA, por serem capazes de bloquear a ação mutagênica de agentes bioativos, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutagênicos ou sequestrando moléculas reativas. Os agentes bioantimutagênicos são compostos que agem sobre processos celulares que levam a indução de mutações, ou atuam no reparo das lesões

causadas no DNA (KADA et al., 1987). Nos estudos de antimutagênese, o tratamento com mutágenos (que induzem as mutações) e com os agentes antimutagênicos (que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA) pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré- ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos que respondem efetivamente aos testes de pré-tratamentos ou a tratamentos simultâneos são considerados agentes desmutagênicos. Quando um agente responde a ação antimutagênica em pós-tratamento, ele é considerado bioantimutagênico, estando relacionado, efetivamente, ao processo de reparo das mutações.

3.2. Veneno de Hymenoptera

Os venenos representam uma grande e inexplorada reserva de compostos bioativos que podem conter a cura para diversas doenças e que ainda não estão disponíveis nas terapias atuais (CALVETE, 2009). Segundo Favreau et al., (2006), venenos de origem animal representam uma rica fonte de compostos bioativos, que, segundo Lewis e Garcia (2003), vêm sendo utilizados em pesquisas da área biomédica e também testados no desenvolvimento de novos fármacos, reagentes para diagnóstico e drogas terapêuticas.

O estudo de venenos produzidos por insetos sociais pode trazer importantes informações sobre a ação destes compostos sobre as atividades biológicas, porque estes compostos possuem diversas substâncias com atividade farmacológica, como proteínas e pequenos peptídeos, além de amins bioativas (PAULA et al., 2006). Dessa forma, o estudo do veneno de vespa e abelhas pode ser extremamente válido na busca de novos compostos com potencial para a utilização terapêutica. Os himenópteros apresentam vantagem para o estudo de venenos, pois, como muitos deles apresentam ninhos constituídos de muitos indivíduos, é possível obter grandes quantidades de veneno, facilitando o desenvolvimento de ensaios. Os venenos de Hymenoptera mais amplamente caracterizados são os venenos de abelha, principalmente do gênero *Apis*, e venenos de vespas sociais.

O veneno da abelha *A. mellifera* tem sido utilizado no tratamento de diversas doenças como artrite, reumatismo, tumores e no alívio de dores (HIDER, 1988). Contém uma variedade de peptídeos e proteínas de vários pesos moleculares biologicamente ativos, incluindo a melitina, apamina, adolapina e a fosfolipase A2.

Além disso, contem aminas biologicamente ativas, como a histamina e a epinefrina (HABERMANN, 1972; DOTIMAS; HIDER, 1987), que possuem propriedades farmacológicas. Diversos estudos descrevem ainda atividades anti-tumoral e anti-carcinogênica para o veneno de abelha (LIU et al., 2002; ORŠOLIĆ et al., 2003; HU et al., 2006; PUTZ et al., 2006). Huh et al. (2010) demonstraram que o veneno de abelha é capaz de inibir a angiogênese pela regulação do VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*-fator de crescimento endotelial vascular) e VEGF-2 em câncer de pulmão (células LLC-células do carcinoma pulmonar de Lewis), suprimir o crescimento destas células e atrasar a disseminação metastática.

Um estudo realizado por Kortesus et al. (1992) com seres humanos demonstrou que a administração de veneno de abelha desencadeia uma diminuição na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), havendo uma diminuição dos danos oxidativos causados pelas EROs (KIM et al., 2002), o que pode indicar uma atividade antioxidativa para o veneno de abelha.

Em um estudo realizado com camundongos por Han et al. (2011), foi observado que o veneno de abelha promoveu uma aceleração na cicatrização dérmica desses organismos, que os autores relacionaram à ação da proteína colágeno-I, devido ao aumento da expressão desta proteína após a administração do veneno.

Assim como os venenos de abelhas, os venenos de vespas também contêm diversos componentes bioquímica e farmacologicamente ativos (NAKAJIMA et al., 1986; NICOLAS et al., 1997; OLIVEIRA; PALMA, 1998; KONNO et al., 2001). Toxinas de vespas podem pertencer a diferentes classes químicas (CUNHA et al., 2005). Dentre os compostos bioativos dos venenos, as enzimas são os compostos de alto peso molecular mais abundantes e as responsáveis pelos efeitos alergênicos (HO et al., 1998; OLIVEIRA; PALMA, 1998). Cunha et al.(2005) demonstraram o efeito anti-convulsivo do veneno denaturado da vespa *P. ignobilis*. Neste estudo, os autores observaram que o veneno contém substâncias capazes de interagir com os receptores GABA e de glutamato, indicando que o veneno possui compostos neuroativos.

A vespa *P. paulista* é uma vespa social neotropical endêmica da região sudeste do Brasil (ROCHA et al., 2007). Estudos realizados por Wang et al. (2008), verificaram a ação anticarcinogênica do peptídeo polybia MPI, presente no veneno da vespa *P. paulista*, e verificaram que houve uma significativa inibição da

proliferação de células tumorais. Wang et al. (2011) estudaram o peptídeo polybia-CP derivado do veneno de vespa e verificaram que, além de possuir atividade antibiótica tanto para bactérias Gram positivas como negativas (SOUZA et al., 2005), este peptídeo possui atividade anti-tumoral, contra linhagem celular de câncer de bexiga (BIU87) e de próstata (PC-3).

3.3. Testes de citotoxicidade

A investigação da citotoxicidade de um determinado agente é importante para avaliar se este agente influencia na viabilidade celular e também se caracteriza em um importante teste para dar seguimento a avaliações de mutagenicidade, apoptose, patologias celulares e toxicidade de drogas farmacêuticas, como também para elucidar mecanismos de carcinogênese (KOMISSAROVA et al., 2005). Atualmente, existe uma série de métodos que medem diferentes “endpoints” para avaliar essa citotoxicidade e, dentre eles, o ensaio do MTT. No ensaio do MTT, o sal 3-(4,5-dimethylthiazolil-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) é absorvido por células vivas e é reduzido a cristais de formazan dentro das mitocôndrias. A quantidade de formazan gerada é proporcional à quantidade de células vivas (HOLST; OREDSSON, 2005).

3.4. Testes de antimutagenicidade

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em diversos sistemas biológicos, sistemas estes igualmente empregados para o estudo e identificação dos agentes mutagênicos. Métodos *in vitro* são adequados para a determinação dos mecanismos de ação de uma substância ou composto; oferece uma melhor padronização das etapas experimentais; introduz variáveis como tempo de tratamento e tipos de combinações (OLIVEIRA et al., 2006); possibilita o tratamento das células em várias fases do ciclo celular; além de ter um material genético organizado como nas células *in vivo* (RABELO-GAY et al., 1991). Dentre os métodos *in vitro*, a utilização de células de mamíferos pode permitir correlações com os efeitos de xenobiontes em seres humanos (BRUSICK, 1987).

Os sistemas celulares de mamíferos, utilizados para a avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, abrangem tanto testes *in vitro* e *in vivo*.

Nos testes *in vivo* ratos e camundongos são utilizados como organismos testes. Nos testes *in vitro*, com sistemas celulares de mamíferos, o tempo de tratamento com a substância testada pode ser estritamente controlada. Em testes de antimutagenicidade, as células podem ser tratadas com a substância teste antes, simultaneamente ou após o tratamento com os mutágenos. Esses procedimentos podem fornecer sugestões sobre o mecanismo de ação antimutagênica da substância e informar se ela atua como substância desmutagênica ou bioantimutagênica (KURODA et al., 2001).

A cultura de células HepG2, uma linhagem celular derivada de hepatomas humanos, mantém muitas das funções das células normais de fígado (KNOWLES et al., 1980) e expressa diferentes enzimas metabolizadoras de xenobióticos (DOOSTDAR et al., 1993; KNASMÜLLER et al., 1998). Estas células têm sido amplamente utilizadas e recomendadas para detectar mutágenos, pró-mutágenos e anti-mutágenos (NATARAJAN; DARROUDI, 1991; KNASMÜLLER et al., 1998; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003), por serem facilmente manuseadas e por possuírem a maioria das características morfológicas das células hepáticas, além de conter grande parte das enzimas responsáveis pela ativação de vários compostos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

Os testes mais comumente aplicados em cultura de células são o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo. O ensaio do cometa é uma técnica que permite detectar lesões no DNA, tais como quebras de fita simples, quebras de fitas duplas e sítios álcali-lábeis, causadas por agentes genotóxicos (RIBEIRO et al., 2003). Este teste consiste em uma técnica valiosa, pois permite a detecção de diferentes respostas celulares ao dano e ao reparo de DNA, observadas pela migração, em eletroforese, de fragmentos do material genético de qualquer tipo celular obtido por uma suspensão simples (SASAKI et al., 1997, MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

O ensaio do cometa possui diversas vantagens como identificar danos no DNA em células isoladas; necessitar de pequena quantidade de células por amostra; ser de aplicação fácil e barata e poder ser realizada em um curto período de tempo (LIAO et al., 2009), além de ser também uma técnica flexível, podendo ser usada para se avaliar diferentes tipos de dano ao DNA e ser facilmente modificável às necessidades experimentais (TICE et al., 2000).

O teste do micronúcleo também apresenta vantagens pela simplicidade de análise de resultados e pela possibilidade de aplicação em qualquer população

celular em proliferação, sem a necessidade do conhecimento cariotípico prévio do organismo-teste (HAYASHI et al., 1998). Este teste possibilita uma detecção rápida de danos causados no material genético de organismos expostos às substâncias testadas, como as quebras cromossômicas ou as perdas de cromossomos inteiros. Estas perdas de material genético são facilmente visualizadas nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN) é o método mais utilizado para se medir micronúcleos em cultura de células humanas e/ou de mamíferos. Este método contabiliza e classifica as células que especificamente já passaram por um ciclo de divisão celular, após exposição ao químico avaliado. Ao longo dos últimos anos o teste CBMN evoluiu para um método que também contabiliza pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares (FENECH, 2006).

Micronúcleos se originam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se atrasaram durante a migração cromossômica que ocorre na divisão nuclear (FENECH, 2000). A frequência de micronúcleos em células humanas se tornou um teste citogenético padrão para testes de toxicologia genética (FENECH, 2006).

As pontes nucleoplasmáticas presentes em células binucleadas também devem ser contabilizadas, por serem alterações que fornecem evidências diretas de dano genômico resultantes de reparos incorretos de quebras de DNA, o que não seria possível pela contabilização apenas de células micronucleadas (FENECH, 2006). Os brotos nucleares são derivados de amplificação gênica que, segundo os resultados dos experimentos *in vitro* com células de mamíferos realizados por Shimizu et al. (1998, 2000) são indicativos que o DNA amplificado está seletivamente posicionado em locais específicos na periferia do núcleo e que é eliminado via broto nuclear durante a fase S da mitose.

3.5. Teste de estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando um aumento nas concentrações de agentes pró-oxidantes supera a capacidade antioxidante, o que pode levar a danos oxidativos na célula (KOHEN; NYSKA, 2002). As células estão constantemente expostas a uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e

espécies reativas de nitrogênio (RNS), tanto de origem endógena como exógena (KOHEN; GATI, 2000). O contínuo efluxo de ROS (endógeno e exógeno) resulta em um contínuo e acumulativo dano oxidativo em componentes celulares (COMPORTI, 1989), que pode acarretar em alterações das funções celulares (GRACY et al., 1999). Segundo revisão feita por Kohen e Nyska (2002), dentre os alvos biológicos mais vulneráveis para as ERO, estão os lipídeos de membranas biológicas, as proteínas e o DNA. Ainda segundo Kohen e Nyska (2002), todas as membranas celulares são especialmente vulneráveis a oxidação, devido a sua grande concentração de ácidos graxos insaturados. Os danos que ocorrem nos lipídeos geralmente são denominados de peroxidação lipídica.

Um dos métodos para a avaliação da peroxidação lipídica seria a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dentre eles o malondialdeído (MDA). Estas TBARS seriam dialdeídos, produtos finais da peroxidação lipídica, cuja reação pode ser facilmente medida pela coloração rósea produzida (KOHEN; NYSKA, 2002). A peroxidação lipídica pode desestruturar a organização de membranas biológicas, pela promoção de mudanças na sua fluidez e permeabilidade, inibição de processos metabólicos e alterações no transporte de íons (NIGAM; SCHEWE, 2000).

Embora o DNA seja uma molécula estável e bem protegida, as ROS podem interagir com o DNA e causar diversos tipos de danos, como modificação de suas bases nitrogenadas, perda de purinas (sítios apurínicos), danos na desoxirribose, ligação cruzada DNA-proteína, quebras das fitas simples e duplas, e danos no mecanismo de reparo do DNA (KOHEN; NYSKA, 2002).

Os organismos possuem sistemas para inativar e/ou bloquear os efeitos deletérios das EROs, sendo este sistema dividido em duas classes de antioxidantes: o sistema não enzimático constituído por β -carotenos (pró vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e alfa tocoferol (vitamina E) e o sistema enzimático constituído pelas enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e superóxido dismutase (SOD) (POWERS et al., 1994).

O uso de biomarcadores bioquímicos oferece vantagens, porque são normalmente os primeiros a serem detectados, devido à sua sensibilidade a xenobiontes; por apresentarem alta especificidade; por possuírem baixo custo de análise e fornecerem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo agente indutor do dano (VAN DER OOST et al., 2003). Dentre os biomarcadores

bioquímicos, os mais extensivamente investigados são as enzimas envolvidas com a detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação, como a Glutathione S Transferase (GST) e de defesa antioxidante. Durante a biotransformação de agentes químicos pelo citocromo P450, pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem oxidar as células e, desta forma, leva-las à morte. Estas EROs podem ser inativadas pelos sistemas de defesas antioxidantes celulares.

Segundo Matés et al. (1999), a superóxido dismutase (SOD) é a enzima antioxidante que catalisa a dismutação (conversão) do ânion extremamente reativo, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a O_2 e H_2O_2 .

A catalase está presente na maioria dos órgãos, mas é mais abundante no fígado. Em altas concentrações de H_2O_2 , a catalase é capaz de reduzir esta molécula, mas quando em baixas concentrações de H_2O_2 sua eficiência é diminuída, porque a enzima necessita de duas moléculas de H_2O_2 para poder realizar a reação de redução, e esta reação dificilmente ocorre quando a quantidade do substrato diminui (CEMELI et al., 2009).

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Substâncias testadas

4.1.1.1. Extratos brutos

O veneno liofilizado da abelha *A. mellifera* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Osmar Malaspina, do Centro de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro.

Vespas da espécie *P. paulista* foram gentilmente cedidas pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro. Após a captura destes insetos, eles foram imediatamente congelados a -80°C , para serem posteriormente dissecados. Para a obtenção do veneno, foram extraídos, com auxílio de pinças, 1160 glândulas de venenos. As glândulas de veneno foram cuidadosamente lavadas, perfuradas, agitadas suavemente em solução contendo Inibidor de Protease 1 mM (PMSF- Floureto de Sulfonil Metil Fenil) e centrifugados a 8000 rpm, por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi usado como extrato bruto do veneno e posteriormente foi liofilizado em liofilizador “Centrivap Concentrator” (Labconco), acoplado a um condensador de solvente “Centrivap Ultra Low Cold Trap” (Labconco).

Foram obtidos, aproximadamente, cerca de 100 mg de peso seco de veneno de abelha, cerca de 39,7 mg de peso seco de veneno de vespa.

4.1.1.2. Fosfolipase A₂

A fosfolipase A₂ de *A. mellifera* (CAS number: 9001-84-7) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich.

4.1.1.3. Controle positivo

Para os teste controle positivo, a ser realizado com cultura de células HepG2, foi utilizado o metilmetano sulfonato (MMS, CAS No 66-27-3), na concentração de 4×10^{-2} M. Esta substância é um alquilante monofuncional que age diretamente nos átomos de nitrogênio e oxigênio das bases do DNA, causando um grande espectro de lesões no DNA. O MMS induz aumento na frequência de danos do DNA, mutação

gênica, troca entre cromátides irmãs e micronúcleo em cultura de células de roedores e de humanos.

4.1.2. Material Biológico

Células HepG2 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC No HB 8065, Rockville, MD) e foram utilizadas para realização das técnicas do MTT, cometa, micronúcleo e estresse oxidativo.

4.2. Métodos

4.2.1. Cultura de células HepG2

As células foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm² em 5 mL de meio MEM (Meio Essencial Mínimo – Cultilab), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% solução de antibiótico-antimocótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, até atingirem confluência de 80%. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem celular é de aproximadamente 24 horas.

4.2.2. Ensaio do MTT

O teste do MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - CAS n. 298-93-1, Sigma) foi realizado de acordo com o protocolo de Mosmann (1983), com algumas modificações.

Após atingir confluência de aproximadamente 80%, as células HepG2 foram transferidas do frasco de cultura para uma placa de 96 poços, para isso as células foram lavadas com PBS (2x) e o excesso de PBS foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Posteriormente 500 µL de tripsina (0,5%) foram adicionados ao frasco de cultura, permanecendo no frasco por 5 minutos em estufa a 37°C. Após este período, as células foram despregadas da parede do frasco por meio de leves batidas, posteriormente foram adicionados ao frasco de cultura 4,5mL de meio MEM com soro, a fim de inativar a tripsina, e as células passaram por uma seringa de insulina, para se obter células isoladas e uma suspensão celular mais homogênea. 20 µL desta suspensão foram transferidos para uma câmara de Neubauer para

contagem de células e o restante da suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga graduado. Estes tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de meio MEM com soro. Uma alíquota desta suspensão foi diluída em 9 mL de meio MEM com soro, a fim de que em cada poço da placa de 96 poços recebesse um volume de 100µL, para ser semeada uma quantidade de $2,34 \times 10^4$ células. Subsequentemente, esta placa foi incubada por 24 horas para estabilização das células. Decorrida às 24 horas, o meio foi retirado com o auxílio de uma pipeta multicanal e foi adicionado 200 uL de meio de cultura sem soro (controle negativo - CN), meio de cultura sem soro mais Triton X-100 a 1% (CP) e meio de cultura sem soro mais os tratamentos (com as diferentes concentrações das substâncias testadas), permanecendo aí por um período de 3 horas. Posteriormente, os tratamentos foram retirados e adicionados 150 uL de solução de 5 mg/mL de MTT. A placa, envolta em papel alumínio, foi incubada por 4 horas em estufa a 37° C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada, sendo adicionado em cada poço 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram então lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific) em filtros de 540nm. As leituras obtidas para o controle negativo foram consideradas como 100% de viabilidade e as leituras obtidas para os demais tratamentos foram comparadas com o controle negativo. A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

A partir do ensaio do MTT, foram estabelecidas as concentrações não citotóxicas das substâncias testadas e, com elas, realizados o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, para se determinar a genotoxicidade e a mutagenicidade dos compostos.

4.2.3. Ensaio do cometa

Para o ensaio do cometa 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm², onde permaneceram por um período de 24 horas em estufa de CO₂ (5%) a 37° C para estabilização das células.

Passado este período, os tratamentos foram adicionados aos frascos de cultura onde permaneceram por 3 horas, sendo utilizado PBS para o controle

negativo e metilmetano sulfonato (MMS - 4×10^{-2} M) para o controle positivo. As concentrações consideradas não citotóxicas das substâncias testadas foram utilizadas para se avaliar a genotoxicidade dos compostos estudados. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

As concentrações consideradas não genotóxicas foram utilizadas para a avaliação de antigenotoxicidade, sendo realizados quatro tipos diferentes de tratamento:

- pré-tratamento: as células foram expostas às diferentes concentrações das substâncias por 3 horas. Passado este período, o meio foi retirado e as células expostas ao meio de cultura novo contendo metilmetano sulfonato (MMS, CAS No 66-27-3) na concentração de 4×10^{-2} M por mais 3 horas;

- pós-tratamento: onde as células foram expostas ao MMS (4×10^{-2} M) por 3 horas. Passado este período, o meio foi retirado e as células expostas a meio de cultura novo contendo diferentes concentrações das substâncias por mais 3 horas;

-tratamento simultâneo: neste tratamento as células foram expostas simultaneamente ao MMS (4×10^{-2} M) e às diferentes concentrações das substâncias por 3 horas;

-tratamento simultâneo com incubação: o MMS (4×10^{-2} M) foi incubado previamente, durante 1 hora à 37° C, com as diferentes concentrações das substâncias e, após este período de incubação, as células foram expostas a esta mistura por 3 horas.

Após os períodos de tratamento, as células foram lavadas com PBS (2x) e o excesso foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pauster. A seguir, as células foram tripsinizadas (0,5% por 5 minutos em estufa a 37° C). Decorrido este tempo a tripsina foi inativada com 4,5 mL de meio MEM com soro e as células foram desprendidas da parede do frasco com leves batidas. A suspensão celular foi transferida para tubos de plástico graduados e centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi retirado e, aproximadamente, 0,5 mL de meio foi deixado no tubo graduado, para que o pellet fosse ressuspendido neste volume.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método da coloração exclusiva com Azul de Trypan. Para isso, 5 μ L da suspensão celular foram misturados com 5 μ L de Azul de Trypan. Foram analisadas 100 células, sendo consideradas células viáveis as que apresentaram coloração branca e inviáveis (mortas) as azuis. O ensaio do

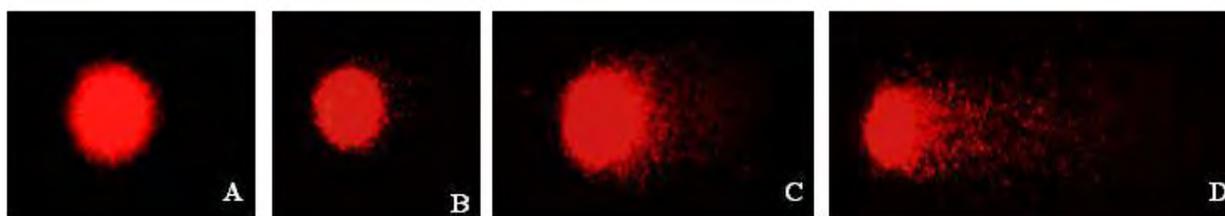
cometa só prosseguiu quando a viabilidade celular encontrada em todos os tratamentos foi superior a 80%.

Após a avaliação da viabilidade celular, uma alíquota de 20 μ L de suspensão celular foi misturada com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) 0,5% e, rapidamente, pingada sobre lâminas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (60°C) 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas à geladeira a uma temperatura de 4°C por 20 minutos. Após remoção cuidadosa das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada 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), mais 1 mL de triton X-100 e 10 mL de DMSO, onde permaneceram por, no mínimo, 1 hora em geladeira 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 10N NaOH e 200mM 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 39V (0,8V/cm) e 300 mA. Após a corrida de eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M tris-HCl, pH7,5), em três séries de 5 minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol por 10 minutos.

Após a secagem e fixação das lâminas, elas foram coradas com 50 μ L de solução de GelRed® (15 μ L de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e cobertas com lamínula. O material foi imediatamente analisado após a sua coloração. Cem nucleóides por lâmina foram analisados em microscopia de epifluorescência Leica, aumento de 400x, filtro B - 34 (excitação: λ =420nm-490nm, barreira: λ =520nm), totalizando 600 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram visualmente classificados de acordo com o tamanho das caudas em quatro classes: classe 0, nucleóide sem cauda; classe1, nucleóide com cauda menor que o seu diâmetro; classe 2, nucleóide com cauda entre 1 a 2 o seu diâmetro e classe 3, nucleóide com cauda 2 vezes maior que o seu diâmetro (Rigonato et al., 2005) (Figura 1).

Figura 1. Classificação das classes do cometa. **A:** Classe 0, **B:** Classe 1, **C:** Classe 2 e **D:** Classe 3.



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 300 (dano máximo causado).

4.2.4. Teste do micronúcleo

Para o teste do micronúcleo, 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm^2 , onde permaneceram por um período de 24 horas em estufa de CO_2 (5%) a 37°C para estabilização das células.

Passado este período, os tratamentos foram adicionados aos frascos de cultura, onde permaneceram por 3 horas, sendo utilizado PBS para o controle negativo e metilmetano sulfonato (MMS - $4 \times 10^{-2} \text{M}$) para o controle positivo. As concentrações consideradas não citotóxicas no teste do MTT foram utilizadas para a avaliação da mutagenicidade. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

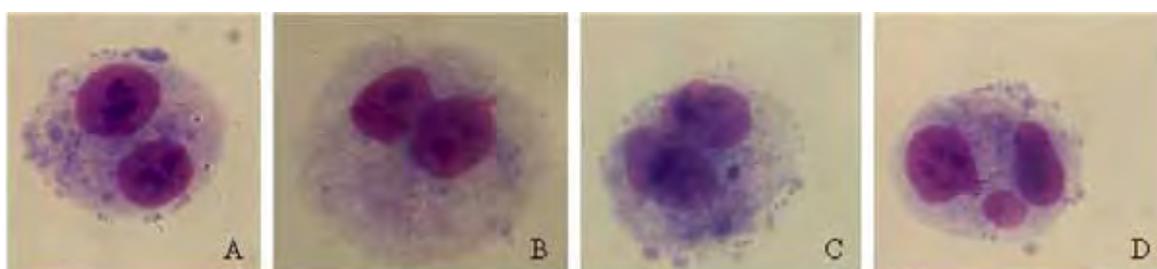
As concentrações consideradas não mutagênicas foram utilizadas para a avaliação de antimutagenicidade, sendo realizados os mesmos quatro tipos de tratamento mencionados no ensaio do cometa

Após os períodos de tratamentos, as células foram lavadas com PBS, o meio trocado e adicionado citocalasina B (concentração final de $3 \mu\text{g/mL}$). As células foram então incubadas por mais 28 horas e centrifugadas (1500 rpm por 5 minutos). Após descarte do sobrenadante, foram adicionados ao pellet, a solução fixadora de Carnoy (3 partes de metanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial) e 2 gotas de formaldeído.

Antes da confecção das lâminas, as células 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, após serem secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos.

Foram contadas 2000 células binucleadas por réplica. As células consideradas para a análise apresentaram envoltório nuclear e limite citoplasmático íntegros, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e um mesmo padrão e intensidade de coloração, totalizando 6000 células por tratamento. Além disso, foram também contabilizados no ensaio as células portadoras de pontes nucleoplásmicas e os brotos nucleares (Figura 2).

Figura 2. **A.** Célula binucleada normal; **B.** Célula binucleada com broto; **C.** Célula binucleada com micronúcleo pequeno; **D.** Células binucleada com micronúcleo maior.



4.2.5. Ensaio do estresse oxidativo

Neste ensaio foram realizados os testes de peroxidação lipídica e mensuração da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutiona S-transferase (GST).

Para os testes de peroxidação lipídica, catalase e superóxido dismutase, foi utilizada uma quantidade de 3×10^6 células, enquanto que para os ensaios de glutiona S-transferase a quantidade de células foi de 1×10^6 células. Para todos os ensaios, as células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm^2 , onde permaneceram por um período de 24 horas para estabilização. Após este período, os diferentes tratamentos foram adicionados nos frascos (veneno de vespa e abelha e PLA_2), permanecendo nestes por 3 horas. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

Após as 3 horas, os tratamentos foram retirados dos frascos e as células foram lavadas com PBS (2x). O excesso de líquido foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e 1mL de PBS gelado foi adicionado ao frasco de cultura. As células foram então despregadas da parede do frasco com o auxílio de um “scraper” e a suspensão celular transferida para tubo de centrífuga graduado. Esta suspensão foi

sonicada em Sonicador (Fischer Scientific – Sonic Dismembrator Model 500), sendo utilizada a frequência de 17% e tempo de 1 segundo para cada mL de suspensão celular.

4.2.5.1. 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 3×10^6 células/mL) em um meio contendo TBA 1% (preparado em NaOH 50 mM), 10 μ L de NaOH 10 M e 500 μ L de H_3PO_4 20%. Essa mistura foi aquecida por 10 minutos em banho fervente. Passado este tempo, a mistura foi resfriada e 3 mL de n-butanol foi adicionado, para a extração do cromógeno. Em seguida, esta mistura foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, para separar a fase orgânica (com cromógeno) e, assim, ser lida a sua absorbância em 532 nm. A concentração de substâncias reativas ao ácido TBARS foi calculada baseando-se no valor de $\epsilon_{532} = 153000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4.2.5.2. Avaliação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi medida segundo o método de Aebi (1984). Em uma cubeta de quartzo foram misturados 200 μ L da suspensão celular e 2 mL de PBS 0,1 M (pH 7,4, temperatura ambiente). A reação foi iniciada quando foi adicionado 50 μ 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 espectrofotometricamente, através da variação da absorbância em 240 nm.

4.2.5.3. Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada a partir da sua capacidade de inibir a redução do composto nitrobluetetrazolium (NTB) a formazan, em pH alcalino. Para esta avaliação, foi utilizado o sistema xantina/xantina oxidase que é capaz de gerar o ânion-radical superóxido, que por sua vez é capaz de reduzir o composto NTB (amarelo) em formazan (azul). O ensaio foi desenvolvido em uma solução contendo 3 mL de NTB 100 μ M (Nitro Blue Tetrazolium Tablet – Sigma N5514-10TAB), diluído em tampão glicina 50 mM (pH 9,5), 100 μ L de xantina 15 mM (Xanthine, minimum 99% - Sigma- X375 – 25g)

dissolvido em DMSO e 200 μ L da suspensão celular (3×10^6 células/mL). A reação foi iniciada com a adição de 20 μ L de 10 mU de xantina oxidase. A formação do cromógeno azul foi acompanhado espectrofotometricamente em 560 nm.

4.2.5.4. Avaliação da atividade da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da glutathione S-transferase foi medida pelo o kit Glutathione S-Transferase Assay Kit (Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, MI, USA), segundo as instruções do fabricante. A conjugação do 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida foi medida espectrofotometricamente a 340 nm.

4.2.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas pela Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet, com nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0

5. Resultados

Os resultados obtidos estão reunidos em 4 artigos, como segue:

1. “Efeitos citotóxicos, genotóxicos/antigenotóxicos e mutagênicos/antimutagênicos do veneno da vespa *Polybia paulista*”.
2. “Citotoxicidade, genotoxicidade/antigenotoxicidade e mutagenicidade/antimutagenicidade de veneno de *Apis mellifera*”
3. “Comparação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do veneno de vespa *Polybia paulista*, de abelha *Apis mellifera* e da fosfolipase A₂”
4. “Estresse oxidativo induzido por veneno da vespa *Polybia paulista*, da abelha *Apis mellifera* e da fosfolipase A₂”

**Efeitos citotóxicos, genotóxicos/antigenotóxicos e
mutagênicos/antimutagênicos do veneno da vespa *Polybia paulista***

Márcia M. Hoshina¹, Lucilene D. Santos², Mario S. Palma¹, Maria A. Marin-Morales^{1*}

¹UNESP, Avenida 24 A, 1515, CP 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.

²UNESP, Rua José Barbosa de Barros, 1780, CP 577, 18610-307 Botucatu, SP.

*autor correspondente: +55 19 35264143; fax: +55 19 35360009

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Artigo a ser submetido para a Revista Toxicon

Resumo

Venenos de himenópteros são constituídos por uma mistura complexa de agentes bioativos, química ou farmacologicamente, como as fosfolipases, hialuronidasas e mastoparanos. Os venenos podem ainda conter substâncias que sejam capazes de inibir e/ou diminuir a ação genotóxica e ou mutagênica de outros compostos capazes de promover danos no material genético. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do veneno de *Polybia paulista*, uma vespa neotropical, por meio de ensaios com células HepG2 mantidas em cultura. O potencial citotóxico do veneno de vespa, avaliado pelo ensaio do MTT, foi testado para as concentrações de 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL. Como estas concentrações não foram citotóxicas, elas foram utilizadas para avaliar o potencial genotóxico (ensaio do cometa) e mutagênico (teste do micronúcleo) do veneno. Neste estudo, foi verificado que estas concentrações induziram danos no DNA das células expostas, sendo necessário testar concentrações menores, até se encontrar aquelas que não fossem consideradas genotóxicas e mutagênicas. As concentrações de 1 ng/mL, 100 pg/mL e 10 pg/mL, que não induziram genotoxicidade e mutagenicidade, foram utilizadas em quatro diferentes tratamentos (pós-tratamento, pré-tratamento, tratamento simultâneo com incubação e tratamento simultâneo sem incubação), para se avaliar se estas eram capazes de inibir ou diminuir a ação genotóxica e mutagênica do metilmetano sulfonato (MMS). Nenhuma das concentrações foi capaz de inibir e/ou diminuir a atividade do MMS. A atividade genotóxica e mutagênica do veneno de *P. paulista* pode ter sido ocasionada pela ação da fosfolipase, mastoparano e hialuronidase, que são capazes de desestruturar a membrana celular e assim interagir com o material genético das células ou ainda por facilitar a entrada de outros compostos do veneno que podem agir sobre o DNA. Outra possível explicação para a genotoxicidade e mutagenicidade do veneno pode ser dada pela presença de substâncias capazes de desencadear processos inflamatórios e, conseqüentemente, gerar espécies reativas de oxigênio que podem interagir com o DNA das células expostas.

Palavras-chave: célula HepG2, genotoxicidade, mutagenicidade, fosfolipase, mastoparano e hialuronidase

1. Introdução

A cada ano, milhares de novas substâncias são sintetizadas e lançadas no ambiente, sendo praticamente impossível não nos expormos a elas. Diversos estudos correlacionam à exposição de organismos vivos a poluentes ambientais com a indução de danos no material genético desses organismos. Por este motivo, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de encontrar substâncias que possam proteger o DNA das agressões dos xenobiontes.

Venenos de himenópteros, como os das abelhas e vespas, possuem em sua composição substâncias com ação antimicrobianas, peptídeos citolíticos e uma complexa mistura de enzimas, neurotoxinas e compostos de baixo peso molecular (Kuhn-Nentwig, 2003). Segundo Santos et al. (2007), existem no Brasil quase 500 espécies de vespas sociais, das quais pouco se sabe a respeito da bioquímica, farmacologia e imunologia dos seus venenos. Os venenos de himenópteros da família Vespidae (vespas) contêm fosfolipases A e B, assim como hialuronidases, fosfatases ácidas, proteases e mastoparanos (Nakajima et al., 1985, King; Valentine, 1987).

Diversos estudos têm descrito a presença de substâncias com potencial farmacológico nos venenos de vespas, e dentre elas algumas com potencial antimicrobiano (Čeřovský et al, 2008), anticonvulsivante (Cunha et al., 2005) e anticoagulante (Han et al., 2008). Estes estudos demonstram também que os venenos de himenópteros podem constituir uma área de estudo rica e promissora para o descobrimento de novos biofármacos, dentre estes os que tenham a capacidade de diminuir e/ou evitar mutações no material genético.

Polybia paulista é uma vespa neotropical endêmica do sudeste da Brasil, de comportamento muito agressivo que, devido às suas picadas, causa muitos acidentes na região (Santos et al., 2007). Estudos feitos com o veneno desta espécie verificaram que ele possui em sua composição substâncias com potencial antimicrobiano (Souza et al., 2005, 2009) e antitumoral (Wang et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica, genotóxica e antigenotóxica, mutagênica e antimutagênica de veneno da vespa *P. paulista*, por meio de ensaios com células humanas mantidas em cultura (HepG2).

2. Material e métodos

2.1. Material

2.1.1. Substância utilizada

2.1.1.1. Veneno de vespa (VV)

Vespas da espécie *P. paulista* foram identificadas e gentilmente cedidas pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro. Após a captura, os insetos foram imediatamente congelados a -80° C, para serem posteriormente dissecados. Para a obtenção do veneno, foram extraídos, com auxílio de pinças, 1160 glândulas de venenos. As glândulas foram cuidadosamente lavadas, perfurados e agitados suavemente em solução contendo Inibidor de Protease 1 mM (PMSF- Floureto de Sulfonil Metil Fenil) e centrifugados a 8000 rpm, por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi usado como extrato bruto do veneno. Estas amostras foram liofilizadas em liofilizador “Centrivap Concentrator” (Labconco), acoplado a um condensador de solvente “Centrivap Ultra Low Cold Trap” (Labconco).

2.1.1.2. Modelo Experimental

Cultura de células humanas

Células HepG2, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC No HB 8065, Rockville, MD), foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm^2 em 5 mL de meio MEM (Meio Essencial Mínimo – Cultilab), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de CO_2 (5%), até atingirem 80% de confluência.

2.2. Métodos

2.2.1. Teste do MTT

O teste do MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - CAS n. 298-93-1, Sigma) com células HepG2 foi realizado de acordo com o protocolo de Mosmann (1983), com algumas modificações. Foram semeadas em cada um dos poços de uma placa de 96 poços $2,34 \times 10^4$ células. Subsequentemente, esta placa foi incubada por 24 horas para estabilização das células. Decorrido esse tempo, foi retirado o meio de cultura dos poços, para serem adicionados 200 uL de meio de

cultura sem soro para o controle negativo (CN); meio de cultura sem soro mais Triton X-100 a 1% para o controle positivo (CP) e meio de cultura sem soro mais as diferentes concentrações do veneno de vespa para os tratamentos. Após 3 horas de incubação, os tratamentos foram retirados dos poços e adicionados nestes 150 μ L de solução de 5 mg/mL de MTT. A placa foi incubada por 4h, em estufa a 37° C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada, sendo adicionado, em cada poço, 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram então lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific) em filtros de 540 nm. A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

2.2.2. Ensaio do cometa com células HepG2

O ensaio do cometa foi realizado para avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico dos venenos de vespa, feito de acordo com o protocolo descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata/tratamento.

Tanto para o ensaio de genotoxicidade como para o de antigenotoxicidade, 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm^2 . Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37° C, 5% de CO_2 em atmosfera úmida, para um período de estabilização. Passado este tempo, foram feitas duas avaliações, a de genotoxicidade, onde as células foram expostas a diferentes concentrações do veneno de vespa por 3 horas; e a de antigenotoxicidade, onde foram realizados quatro diferentes tipos de tratamento:

- pré-tratamento (PT): as células foram expostas às diferentes concentrações do veneno de vespa por 3 horas. Passado este período, o meio foi retirado e as células foram expostas a meio de cultura novo contendo metilmetano sulfonato (MMS, CAS No 66-27-3) na concentração de 4×10^{-2} M, por mais 3 horas;

- pós-tratamento (Post): as células foram expostas ao MMS (4×10^{-2} M) por 3 horas. Passado este período, o meio foi retirado e as células foram expostas a meio de cultura novo contendo diferentes concentrações do veneno de vespa, por mais 3 horas;

- tratamento simultâneo (TS): as células foram expostas simultaneamente ao MMS (4×10^{-2} M) e às diferentes concentrações do veneno de vespa, por 3 horas;

- tratamento simultâneo com incubação (TSI): o MMS (4×10^{-2} M) foi incubado previamente, durante 1 hora à 37° C com os venenos de vespa e, após este período de incubação, as células foram expostas a esta mistura, por 3 horas.

Além destes tratamentos, foram também realizados os tratamentos de controle negativo (CN, 50 μ L de PBS) e controle positivo (CP, MMS, 4×10^{-2} M).

Após os tempos de tratamento, tanto para avaliação de genotoxicidade como de antigenotoxicidade, as células foram coletadas e, após a obtenção da suspensão celular, submetidas ao teste de viabilidade celular com Azul de Tripán (Gibco), de acordo com a metodologia descrita por Salvadori et al. (2003). Para esta avaliação, 5 μ L da suspensão celular foram misturadas com 5 μ L de Azul de Tripán, onde foram contadas 100 células de cada tratamento. As células coradas em branco foram consideradas vivas e as em azul mortas.

Após a contagem da viabilidade celular, 20 μ L da suspensão celular foram misturadas a 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 37° C. Em seguida, esta suspensão celular foi disposta em uma lâmina previamente revestida com agarose normal e recoberta com lamínula. Após breve período de solidificação da agarose a 4° C (15 minutos), as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (1mL de Triton X-100, 10mL de DMSO e 89 mL de lise estoque – NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10mM e ~8g de NaOH, pH=10), no escuro, a 4° C, por no mínimo, 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e recobertas com tampão alcalino (NaOH 300 mM+EDTA 1 mM, pH>13) e deixadas aí por 20 minutos para estabilização. Após este período, foram submetidas a uma eletroforese a 39V, 300 mA (~ 0,8V/cm), por 20 minutos. Decorrido este tempo de eletroforese, as lâminas foram retiradas e neutralizadas em tampão Tris (pH 7,5) e fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e armazenadas à 4° C, até a realização das análises. As lâminas foram coradas com 50 μ L de solução de GelRed® (15 μ L de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1 M e 45 mL de água destilada) e analisadas imediatamente após a sua coloração. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina em microscopia de epifluorescência Leica, aumento de 400x, filtro B - 3⁴ (excitação: $\lambda=420$ nm-490 nm, barreira: $\lambda=520$ nm), totalizando 600 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados visualmente e alocados em uma das quatro classes (0, 1, 2, 3) de acordo com a migração dos fragmentos como segue: classe 0, sem cauda; classe 1, cauda pequena com tamanho menor que o diâmetro da cabeça (núcleo); classe 2, tamanho

da cauda igual ao diâmetro da cabeça ou até duas vezes o diâmetro da cabeça e classe 3, cauda maior que o diâmetro da cabeça (Rigonato et al., 2005).

O escore total foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo dano da classe, de acordo com a fórmula: $\text{Escore total} = (0 \times n_1) + (1 \times n_2) + (2 \times n_3) + (3 \times n_3)$, onde n = número de células em cada classe analisada. Deste modo, o escore total pode variar entre 0 a 300. A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

2.2.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

O ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN), utilizado para se avaliar a mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes concentrações do veneno de vespa, foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações.

Tanto para o ensaio de mutagenicidade como para o de antimutagenicidade, 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm^2 . Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C , 5% CO_2 em atmosfera úmida, para um período de estabilização. Passado este tempo, foram realizadas duas avaliações: de mutagenicidade, onde as células foram expostas, por 3 horas, a diferentes concentrações do veneno de vespa; e de antimutagenicidade, realizadas por meio de 4 diferentes tipos de tratamento, conforme já descritos para o ensaio do cometa.

Após os tempos de tratamento, tanto para avaliação de mutagenicidade como de antimutagenicidade, as células foram lavadas com PBS. O meio foi trocado e foi adicionada citocalasina B (concentração final de $3 \mu\text{g/mL}$). As células foram então incubadas por mais 28 horas, coletadas, tratadas com solução hipotônica (citrato de sódio 1%) e fixadas com formol (40%) e etanol-ácido acético (3:1). As lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos.

Foram contadas 2.000 células binucleadas por réplica, sendo contabilizados os micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares (Fenech e Crott, 2002). A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ensaio do MTT

O teste do MTT é um ensaio de citotoxicidade em que se mede a viabilidade celular. Este teste se baseia na habilidade de células viáveis conseguirem converter o sal MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Este sal é solúvel em água e é convertido, por células viáveis, em um sal insolúvel de coloração roxa. Este produto não consegue atravessar as membranas celulares de células viáveis, acumulando-se em seu interior (Fotakis e Timbrell, 2006).

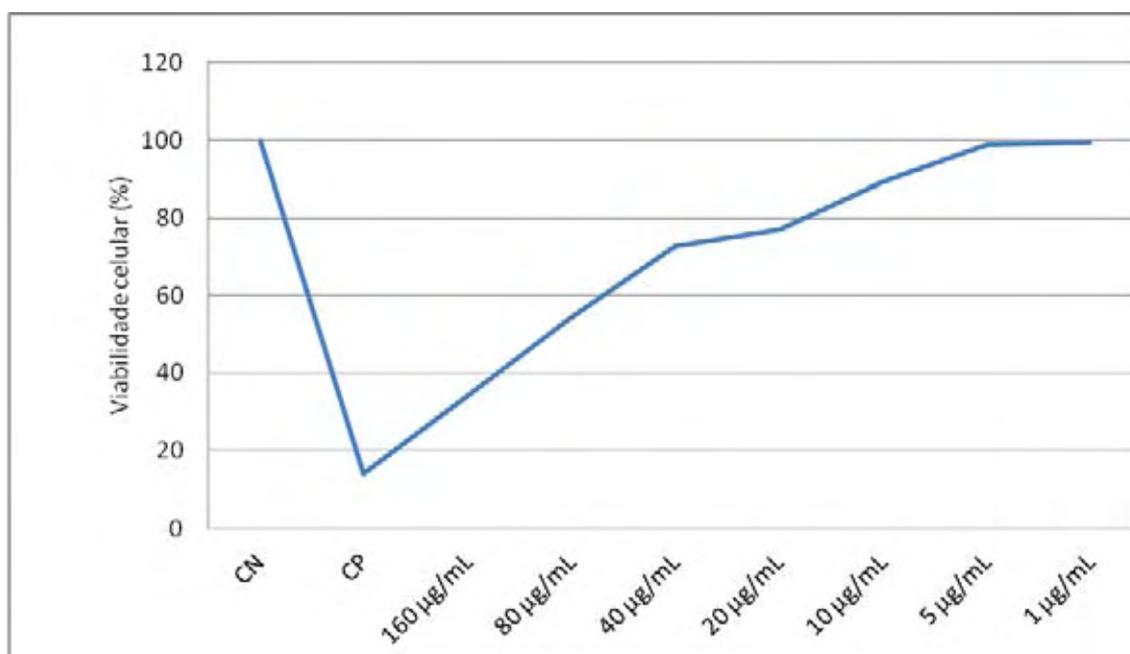
Neste trabalho foram testadas as concentrações de 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL do veneno da vespa *P. paulista*. Os resultados obtidos para o ensaio do MTT estão apresentados na Tabela 1, Figura 1.

Tabela 1. Viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico do MTT, realizado com células HepG2 expostas a diferentes concentrações do veneno da vespa *P. paulista*.

Tratamentos	Viabilidade%(média±DP)
NC	100±0,020
PC	14,1±0,002
160 µg/mL	34,2±0,075*
80 µg/mL	54,2±0,048*
40 µg/mL	72,7±0,035*
20 µg/mL	77,2±0,028*
10 µg/mL	89,4±0,008
5 µg/mL	98,7±0,031
1 µg/mL	99,4±0,04

DP= desvio padrão; CN=controle negativo; CP=controle positivo. Valores seguidos de *são estatisticamente significativos com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0.05).

Figura 1. Viabilidade (%) de células HepG2 expostas à diferentes concentrações de veneno da vespa *P. paulista*.



CN=controle negativo; CP=controle positivo; 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL=concentrações testadas do veneno de *P. paulista*.

Pelos resultados obtidos, observou-se que as concentrações de 10 µg/mL, 5 µg/mL e 1 µg/mL não se mostraram estatisticamente diferentes do controle negativo. Desse modo, pode-se inferir que estas concentrações não foram citotóxicas para as células expostas, após o período de 3 horas de exposição. As demais concentrações se mostraram significativas com relação ao controle negativo, indicando citotoxicidade e, portanto, não indicadas para o uso nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que para a realização destes testes as células expostas precisam ter viabilidade igual ou superior a 80%.

3.2. Ensaio do cometa

Pelos resultados obtidos com o ensaio do MTT, foram selecionadas, para a realização da avaliação inicial da genotoxicidade do veneno de vespa, as concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL desta substância. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Como estas concentrações se mostraram genotóxicas, foram testadas novas concentrações, para se encontrar concentrações que não induzissem danos genotóxicos (0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,01 µg/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL e 10 pg/mL).

Tabela 2. Ensaio do cometa com células HepG2 expostas a diferentes concentrações do veneno da vespa *P. paulista*.

Tratamentos	Número de células em cada classe do cometa				Score de dano (Média±DP)	Viabilidade celular % (Média±DP)
	Categorias de migração (Média±DP)					
	0	1	2	3		
CN	93,6±1,53	1±1	2,33±0,57	3±0	14±1	96±0,016
CP	0,33±0,58	3,67±1,15	6,33±1,15	89,67±1,53	285,33±2,08*	97±0,015
10 µg/mL	68,67±3,06	13,67±6,11	4±1	13,67±2,08	62,67±2,52*	96,43±0,004
5 µg/mL	70,67±4,16	4,67±0,58	4,33±0,58	20,33±3,51	73,33±10,07*	96±0,017
1 µg/mL	76,67±1,53	7,67±0,58	4,67±2,52	11±1	50±3,46*	96,03±0,02
0,5 µg/mL	80,33±10,07	6,33±2,89	3,67±2,08	9,67±7,37	42,67±24,54*	95±0,018
0,1 µg/mL	89,33±2,52	4,33±1,15	3,33±2,08	3±1	22±8,54*	95,73±0,021
0,05 µg/mL	89,5±1,38	4,5±0,84	2±1,26	4±0,63	20,5±2,58*	95,18±0,068
0,01 µg/mL	92,5±1,38	1,33±1,21	1,5±1,04	4,66±1,03	18,33±2,87*	97,17±0,019
1 ng/mL	92±2	1,33±1,03	2,16±0,75	3,66±0,81	16,6±1,21	98,65±0,005
100 pg/mL	93±1,55	2,33±1,63	1,16±0,41	3,5±1,76	15,16±4,79	98±0,005
10 pg/mL	95,5±1,87	1,83±1,33	0,66±0,51	2,5±1,37	10,66±2,84	99±0,005

CN=controle negativo, CP=controle positivo, DP=desvio padrão. Score de dano: 0 = sem dano; 300 = dano máximo; * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p < 0,05$).

Pelos resultados obtidos, foi observado que as concentrações de 1 ng/mL, 100 pg/mL e 10 pg/mL não foram estatisticamente significativas, em relação ao controle negativo. Deste modo, estas três concentrações foram selecionadas para serem utilizadas nas avaliações do potencial antigenotóxico do veneno da vespa. Os dados referentes à avaliação antigenotóxica estão na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaio do cometa com células HepG2 expostas a diferentes tratamentos com veneno da vespa *P. paulista*.

Tratamentos	Número de células em cada classe do cometa				Escore de dano (Média±DP)	Viabilidade celular % (Média±DP)	
	Categorias de migração (Média±DP)						
	0	1	2	3			
CN	93,6±1,53	1±1	2,33±0,57	3±0	14±1	96±0,016	
CP	0,33±0,58	3,67±1,15	6,33±1,15	89,67±1,53	285,33±2,08*	97±0,015	
1ng/mL	PT	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	9738±0,006
	PosT	0±0	4,5±3,5	6,5±5,85	89±9,25	281,5±18,47*	98,47±0,016
	TS	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	96,63±0,009
	TSI	0±0	0,16±0,4	1±1,09	98,83±1,17	298,66±1,36*	88,93±0,049
100 pg/mL	PT	0±0	0±0	0,83±1,32	99,16±1,33	299,16±1,33*	95,87±0,034
	PosT	0,16±0,4	2±3,34	1,5±1,97	96,33±5,08	294±8,22*	97,17±0,011
	TS	0,33±0,81	0±0	0,16±0,41	99,5±0,83	298,83±2,4*	95,33±0,019
10 pg/mL	TSI	0±0	0,83±0,4	2±1,09	97,16±1,17	296,33±7,11*	98,5±0,011
	PT	0,17±0,41	2,33±2,07	6,17±4,54	91,33±5,89	288,67±7,63*	97±0,004
	PosT	0,33±0,82	16,33±17,18	22,83±19,8	60,50±37,03	243,50±54,88*	96,77±0,036
	TS	0,17±0,41	0,17±0,41	1±2,45	98,67±2,8	298,17±3,25*	96,2±0,013
	TSI	0±0	0,67±1,21	3,67±5,39	95,67±6,35	295±7,38*	95,10±0,013

PT: pré-tratamento, PosT: pós-tratamento, TS: tratamento simultâneo; TSI: tratamento simultâneo com incubação, DP=desvio padrão. Escore de dano: 0 = sem dano; 300 = dano máximo; * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p < 0,05$).

Pelos resultados observados, nenhuma das concentrações testadas (1ng/mL, 100pg/mL e 10pg/mL) foi efetivamente capaz de diminuir e/ou inibir a ação genotóxica do MMS.

3.3. Teste do MN com bloqueio da citocinese (CBMN)

As mesmas concentrações usadas no ensaio do cometa foram também usadas para se avaliar a mutagenicidade do veneno da vespa (10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,01 µg/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL e 10 pg/mL). Os resultados estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, realizado com células HepG2 expostas a diferentes concentrações do veneno da vespa *P. paulista*.

Tratamentos	MN (Média±DP)	Broto (Média±DP)	Ponte (Média±DP)
NC	22±1	9±1,73	0,66±0,57
PC	57,33±2,51*	18,66±1,15*	0±0
10 µg/mL	87±2,64*	41±4,35*	1,33±0,57
5 µg/mL	89,66±6,43*	48±6,08*	2,33±1,52
1 µg/mL	73,33±8,32*	30,66±9,23*	2±1,7
0,5 µg/mL	47,33±3,05*	26±3,46*	0±0
0,1 µg/mL	42,66±6,11*	18,66±2,31*	1,33±1,15
0,05 µg/mL	43,33±4,16*	22,66±2,30*	0,66±1,15
0,01 µg/mL	37,33±1,15*	19,33±1,15*	0,66±1,15
1 ng/mL	24,33±3,78	13±1	3±1,73
100 pg/mL	23,33±1,52	15,66±3,05	3±1,57
10 pg/mL	22±1	14±2	2,66±1,15

CN=controle negativo; CP=controle positivo; MN=micronúcleo; DP=desvio padrão, *= estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p < 0,05$).

Assim como para os danos genotóxicos, as concentrações de 1 ng/mL, 100 pg/mL e 10 pg/mL não foram estatisticamente significativas em relação ao controle negativo. Deste modo, estas três concentrações foram selecionadas para serem utilizadas nas avaliações do potencial antigemutagênico do veneno da vespa (Tabela 5)

Tabela 5. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, realizado com células HepG2 expostas a diferentes tratamentos com veneno da vespa *P. paulista*.

Tratamentos		MN (Média±DP)	Broto (Média±DP)	Ponte (Média±DP)
CN		22±1	9±1,73	0,66±0,57
CP		57,33±2,51*	18,66±1,15*	0±0
1 ng/mL	PT	50,33±5,85*	16±2*	3,66±1,15
	PosT	54,66±2,51*	20±1,73*	4±1,73
	TS	48,66±0,57*	15±2,64*	5±1
	TSI	42,66±4,93*	14,33±1,52*	2,33±3,21
100pg/mL	PT	53,33±0,57*	21±2,64*	3,66±1,52
	PosT	55±3,6*	21,66±0,57*	1,66±1,52
	TS	61±4,58*	26,33±4,04*	8,66±2,3*
	TSI	52,33±6,43*	19,66±8,32*	5,66±4,04
10pg/mL	PT	62±10,53*	26,33±9,23*	2±1,73
	PosT	68±6,24*	26,33±3,78*	1,33±0,57
	TS	56,66±15,63*	25,66±5,03*	0±0
	TSI	48,33±11,3*	26±6,92*	2,33±1,52

PT: pré-tratamento, PosT: pós-tratamento, TS: tratamento simultâneo; TSI: tratamento simultâneo com incubação, CN=controle negativo; CP=controle positivo; MN=micronúcleo; DP=desvio padrão,* = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p<0,05$).

Do mesmo modo que no ensaio de antigenotoxicidade, nenhuma das concentrações testadas foi capaz de inibir e/ou diminuir a mutagenicidade induzida pelo MMS, não sendo então consideradas como bons agentes antimutagênicos.

4. Discussão e conclusão

Os venenos de vespas sociais são ricos em aminas biogênicas, em peptídeos biologicamente ativos e em proteínas (Lorenzi, 2002; Nakajima et al., 1986). Dentre estas substâncias, podemos destacar as fosfolipases, hialuronidases e mastoparanos.

No presente estudo foi observado que as concentrações acima de 10 µg/mL são capazes de induzir a morte de células HepG2, sendo a concentração de 80 µg/mL capaz de induzir a morte de aproximadamente 50% da células. Ressaltamos,

portanto, que é muito difícil ocorrer exposição a essa concentração, uma vez que em uma única ferroada de vespídeos podem ser injetado na pele apenas cerca de 20 µg de veneno. Esta concentração pode, segundo Reisman e Livingston (1992), ser suficiente para desencadear processo de sensibilização em seres humanos. Porém, pelos nossos estudos ela não induziu citotoxicidade para as células expostas. Nossos resultados mostraram ainda que, embora as concentrações mais baixas que 17 µg (10 µg/mL, 5µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,1µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,01µg/mL) não tenham induzido citotoxicidade para células HepG2, elas apresentaram um potencial genotóxico e mutagênico para estas células. Essa capacidade pode ter sido desencadeada em decorrência da ação que diversas proteínas presentes no veneno têm sobre a membrana celular, que podem levar a uma alteração na permeabilidade dessas estruturas celulares. Esta alteração na permeabilidade pode permitir que diversos compostos penetrem na célula e interajam com o DNA, causando mutações.

Dentre as proteínas que são capazes de modificar a permeabilidade celular, estão as hialuronidases. As hialuronidases são glicosidases (El-Safory et al., 2010) capazes de hidrolisar o ácido hialurônico e, assim, digerir parcialmente a matriz extracelular, potencializando a entrada e, conseqüentemente, a ação dos demais componentes do veneno sobre as estruturas celulares (Hoffman, 2006). O ácido hialurônico é um polissacarídeo de alto peso molecular encontrado na matriz extracelular, especialmente nos tecidos conjuntivos. Este polissacarídeo é conhecido como um “lubrificante” responsável pelas propriedades viscoelásticas de tecidos fluidos e como um agente estabilizador e hidratante de tecidos conjuntivos (El-Safory et al., 2010). Segundo Wahby et al. (2012), a hialuronidase aumenta a permeabilidade da membrana das células e causa uma redução na viscosidade dos fluidos injetados nos tecidos

. Outra proteína que pode estar relacionada com a mutagenicidade do veneno de vespa é a fosfolipase. As fosfolipases são proteínas que também têm ação sobre a dupla camada lipídica das células, por desestruturar os fosfolípídeos das membranas biológicas, uma vez que podem catalisar a hidrólise de ligações ester em posições específicas do 1,2-diacil-3,*sn*-fosfoglicerídeo, liberando ácidos graxos (Santos et al., 2007). De acordo com Aoki et al (2007), algumas fosfolipases A (fosfolipase A₁ - PLA₁) podem hidrolisar tanto fosfolípídeos como triacilgliceróis, bem como galactolípídeos. Mas também existem algumas PLA₁ que hidrolisam somente

fosfatidilserina e ácido fosfatídico. A denaturação dos fosfolípidos leva a formação de poros nas membranas, permitindo uma entrada mais facilitada de outros componentes para as células, levando a lise celular, inflamação e dano aos tecidos (Dotimas; Hider, 1987). *P. paulista* apresenta a fosfolipase A₁ que possui ação hemolítica direta em eritrócitos (Santos et al., 2007)

Os mastoparanos, principais componentes dos venenos de vespídeos (Souza et al., 2009), parecem promover a formação de canais iônicos nas membranas lipídicas, levando a lise celular (Li et al., 2000). Estes compostos também aumentam a permeabilidade da membrana para íons e pequenas moléculas, pela formação de poros quando em altas concentrações. Segundo Gusovsky et al. (1991), esta ação se dá, provavelmente, pela interação dos mastoparanos com a proteína de ligação do nucleotídeo guanina, fazendo com que haja um colapso do fosfoinositol. Além disso, os mastoparanos podem estimular a atividade da fosfolipase A2 e C (Perianin; Snyderman, 1989), a mobilização de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (Hirata et al., 2000, 2003), induzir a transição da permeabilidade mitocondrial (Pfeiffer et al., 1995) e a morte celular por necrose e apoptose (Perianin; Snyderman, 1989). Os mastoparanos são tetradecapeptídeos com caráter catiônico e hidrofobicidade variável, mas são geralmente hidrossolúveis, mas quando interagem com as bicamadas lipídicas ou quando em ambientes anisotrópicos assumem formato helicoidal anfipático e possuem como alvo principal a matriz fosfolipídica das membranas, sendo que a sua interação preferencial se dá com fosfolípidos aniônicos da membrana (Cabrera et al., 2011). Os mastoparanos apresentam diversas atividades biológicas como degranulação de mastócitos, liberação de histamina, ativação de proteínas de ligação ao GTP, potencial bactericida e atividade hemolítica (Čeřovský et al., 2008), além de poder inibir, *in vitro*, o transporte de vesículas do Golgi (Weidman; Winter, 1994)

Venenos de vespídeos neotropicais possuem peptídeos policatiônicos, como polybines, que parecem estar relacionados com a ocorrência de inflamação, incluindo o processo inicial de lise da membrana celular (Ribeiro et al., 2004). Segundo um estudo realizado por de Paula et al. (2006), o veneno de *P. paulista* causa inflamação aguda, mas segundo Ferguson e Laing (2010), este evento pode levar a uma série de efeitos adversos, inclusive um aumento nas taxas de mutação somática. Além disso, durante o processo inflamatório há a formação de espécies

reativas de oxigênio (ROS), que são moléculas altamente reativas e capazes de interagir e causar danos no material genético das células (Azad et al., 2008).

Em baixas concentrações, o veneno de *P. paulista* não é capaz de induzir, por si só, danos no material genético, mas, quando uma substância com potencial genotóxico e mutagênico é administrada junto com o veneno, as substâncias presentes no veneno (fosfolipase, hialuronidase e mastoparanos) parecem auxiliar na entrada do agente agressor, uma vez que conseguem desestruturar a membrana celular e, conseqüentemente, permitir a entrada de xenobióticos para a célula. Apesar de diversas substâncias, como por exemplo a Polybia-MPI apresentarem atividade anti-tumoral (Wang et al., 2008, 2009), é preciso cuidado ao se administrar substâncias derivadas do veneno e o próprio veneno de *P. paulista* no tratamento de câncer, uma vez que foi observado neste trabalho que em baixíssimas concentrações o veneno da vespa não apresenta potencial citotóxico, mas pode induzir genotoxicidade e mutagenicidade.

5. Agradecimentos

As autoras agradecem a CAPES e Convênio-REPLAN: 1100.0067969.11.4 pelo apoio financeiro.

6. References

- Aoki, J., Inoue, A., Makide, K., Saiki, N., Arai, H., 2007. Structure and function of extracellular phospholipase A₁ belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89, 197-204.
- Azad, N., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 11, 1-15.
- Cabrera, M.P., Alvares, D.S., de Souza, B.M., Palma, M.S., Riske, K.A., Neto, J.R., 2011. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: lytic activity and clustering observed with giant vesicles. *Langmuir*. 27, 10805-10813.
- Čeřovský, V., Slavinová, J., Fučík, V., Hulačová, H., Borovičková, L., Ježek, R., Bednářová, L., 2008. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. *Peptides*. 29, 992-1003.
- Cunha, A.O.S., Mortari, M.R., Oliveira, L., Carolino, R.O.G., Coutinho-Netto, J., Santos, W.F., 2005. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on

chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comparative Biochemically and Physiology, Part C*.141, 50-57.

Dotimas, E., Hider, R.C., 1987. Honeybee venom. *Bee World*, 68, 51-71.

El-Safory, N.S., Fazary, A.E., Lee, C.K., 2010. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*. 81, 165-181.

Fenech, M., Crott, M.F., 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504, 131-136.

Ferguson, L.R., Laing, W.A., 2010. Chronic inflammation, mutation and human disease. *Mutat. Res.* 690, 1-2.

Fotakis, G.; Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.*160,171-177.

Gusovsky, F., Soergel, D. G.; Daly, J. W., 1991. Effects of mastoparan and related peptides on phosphoinositide breakdown in HL-60 cells and cell-free preparations. *Eur. J. Pharmacol.* 206, 309-314.

Han, J., You, D., Xu, X., Han, W., Lu, Y., Lai, R., Meng, Q., 2008. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*. 51, p.914-922.

Hirata, Y., Nakajata, N., Ohizumi, Y., 2000. Identification of a 97kDa mastoparan-binding protein involving in Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 57, 1235-1242.

Hirata, Y., Atsumi, M., Ohizumi, Y., Nakahata, N., 2003. Mastoparan binds to glycogen phosphorylase to regulate sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release in skeletal muscle. *Biochem. J.* 371, 81-88.

Hoffman, D.R., 2006. Hymenoptera Venom Allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 30, 109-128.

King, T.P., Valentine, M.D., 1987. Allergens of Hymenopteran venoms. *Clin Rev Allergy.* 5, 137-148.

Kuhn-Nentwig, L., 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life Sci.*60,2651-2668.

Li, M.L., Liao, R.W., Qiu, J.W., Wang, Z.J., Wu, T.M., 2000. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. *Int. J.Antimicrob. Ag.* 13, 203-208.

- Lorenzi, C.C.B., 2002. **Estudo Estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias**. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.
- Nakajima, T., Yasuhara, T., Uzu, S., Wajamatsu, K., Miyazawa, T., Fukuda, K., Tsukamoto, Y., 1985. Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. *Peptides.* 6, 425-430.
- Nakajima, T.; Uzu, S.; Wakamatsu, K.; Saito, K.; Miyazawa, T.; Yasuhara, T.; Tsukamoto, Y.; Fujino, M., 1986. Amphiphilic peptides in wasp venom. *Biopolymers* 25, 115-121.
- Natarajan, A.T., Darroudi, F., 1991. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis.* 6, 399-403.
- Paula, L., Santos, W.F., Malheiro, A., Carlos, D., Faccioli, L.H., 2006. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a model of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 6, 182-189.
- Perianin, A., Snyderman, R., 1989. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol triphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 143, 1669-1673.
- Pfeiffer, D.R., Gudz, T.I., Novgorodov, S.A., Erdahl, W.L., 1995. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 270, 4923-4932.
- Reisman, R.E., Livingston, A., 1992. Venom immunotherapy: 10 years of experience with administration of single venoms and 50 micrograms maintenance doses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 89, 1189-1195.
- Ribeiro, S.P., Mendes, M.A., Santos, L.D., Souza, B.M., Marques, M.R., Azevedo Jr. W.F.A., Palma, M.S., 2004. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides.* 25, 2069-2078.
- Rigonato, J., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q., 2005. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.*, 28, 464-468.

- Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., Fenech, M., 2003. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. IN: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds.). Mutagênese Ambiental, Canoas: Ed. ULBRA, 201-223.
- Santos, L.D., Santos, K.S., Souza, B.M., Arcuri, H.A., Cunha-Neto, E., Castro, F.M., Kalil, J.E., Palma, M.S., 2007. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A₁ from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). *Toxicon*. 50, 923-937.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Souza, B.M., Mendes, M.A., Santos, L.D., Marques, M.R., César, L.M.M., Almeida, R.N.A., Pagnocca, F.C., Konno, K., Palma, M.S., 2005. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 26, 2157-2164.
- Souza, B.M., Silva, A.V.R., Resende, V.M.F., Arcuri, H.A., Cabrera, M.P.S., Neto, J.R., Palma, M.S., 2009. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 30, 1387-1395.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Wahby, A.F., Mahdy, E-S. M.E., El-mezayen, H.A., Salama, W.H., Abdel-Aty, A.M., Fahmy, A.S., 2012. Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom hyaluronidase: Purification, partial characterization and evidence for its action as a spreading factor. *Toxicon* 60, 1380-1389.
- Wang, K.R., Zhang, B.Z., Zhang, W., Yan, J.X., Li, J. Wang, R., 2008. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide Polybia-MPI. *Peptides* 29, 963-968.
- Wang, K.R., Yan, J.X., Zhang, B.Z., Song, J.J., Jia, P.F., Wang, R., 2009. Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer Letters* 278, 65-72.

Weidman, P.J., Winter, W.M., 1994. The G-protein-activating peptide, mastoparan and the synthetic NH₂-terminal ARF peptide, ARFp13, inhibit in vitro Golgi transport by irreversibly damaging membranes. J. Biol. Chem. 269, 1815-1827.

Citotoxicidade, genotoxicidade/antigenotoxicidade e mutagenicidade/antimutagenicidade de veneno de *Apis mellifera*

Márcia Miyuki Hoshina, Maria Aparecida Marin-Morales*

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Avenida 24 A, 1515, CP 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.

*autor correspondente: +55 19 35264143; fax: +55 19 35360009

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Artigo a ser submetido para a revista Mutation Research

Resumo

A busca por substâncias capazes de inibir e/ou diminuir os efeitos de substâncias genotóxicas e mutagênicas tem sido o alvo de muitas investigações realizadas nos últimos tempos. Venenos de himenópteros constituem uma fonte considerável de substâncias com potencial farmacológico. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e antígenotóxico, mutagênico e antimutagênico do veneno de abelha *Apis mellifera*, sob células HepG2. Neste avaliação, foi aplicado o ensaio do MTT, para determinar as concentrações mais indicadas para os testes de genotoxicidade e mutagenicidade do veneno da abelha. Foi verificado que as concentrações de 0,1, 0,05 e 0,01 µg/mL não eram citotóxicas, sendo então indicadas para serem utilizadas nos experimentos. Os testes de avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do veneno de abelha foram feitos pelos ensaios do cometa e do micronúcleo, respectivamente. As concentrações acima testadas apresentaram potencial tanto genotóxico como mutagênico para as células HepG2, sendo necessário testar concentrações mais baixas do veneno (10 pg/mL, 1 pg/mL e 0,1pg/mL), para os testes de antígenotoxicidade e antimutagenicidade com o mesmo sistema teste. Os teste de antígenotoxicidade e antimutagenicidade foram realizados, submetendo as células à ação do MMS (metilmetano sulfonato), para verificar a capacidade do veneno inibir ou diminuir a ação deste composto, que tem uma reconhecida ação sobre o material genético. Foram feitos os tratamentos de pré e pós tratamentos e tratamentos simultâneos com ou sem incubação com o veneno. Foi observado que as três concentrações mais baixas testadas não apresentaram qualquer atividade antígenotóxica e antimutagênica sob o sistema HepG2. O uso do veneno de abelha para fins farmacológicos em tratamentos como os do câncer deve ser feito com extrema cautela, pois foi observado que mesmo as concentrações muito baixas do veneno podem induzir genotoxicidade e mutagenicidade para células humanas, como verificado para as células HepG2.

Palavras-chave: micronúcleo, ensaio do cometa, células HepG2 cells, melitina, *Apis mellifera*, teste do MTT

1. Introdução

A crescente poluição ambiental tem intensificado a exposição dos organismos vivos a uma intensidade de novas substâncias químicas, dentre os seus alvos de ação podemos citar o material genético. Assim como os outros organismos vivos, o DNA dos seres humanos também está constantemente exposto a agentes que possam causar danos na sua estrutura [1].

Uma das formas mais efetivas de se evitar os danos no material genético e as possíveis doenças relacionadas com estes danos, como, por exemplo, o câncer, seria o uso de substâncias bioativas, como as de ação antígenotóxicas e antimutagênicas [2]. Por isso, a busca por substâncias que tenham estas características tem crescido bastante.

Diversos estudos tem focado na busca de substâncias antimutagênicas a partir de bioativos de plantas [3-7], mas pouco tem sido feito com substâncias derivadas de venenos de animais. Levando em consideração que os venenos são ricos em substâncias e compostos químicos, um estudo mais detalhado da ação destes compostos sobre as células também pode ser promissor para encontrar substâncias com ação antimutagênica. Dentre os venenos animais, os venenos de vespa e abelha, de acordo com Habermann [8], são misturas complexas de agentes farmacologicamente ou bioquimicamente ativos ou ambos.

Veneno de abelha contém uma variedade de peptídeos como a melitina, apamina, adolapina e o peptídeo degranulador de mastócitos, além de enzimas como a fosfolipase A_2 , aminas biologicamente ativas (histamina, epinefrina) e componentes não peptídicos (lipídeos, carboidratos e aminoácidos livres) [9]. De acordo com Terwilligert e Eisenbergg [10], a melitina, uma proteína pequena com aproximadamente 26 resíduos de aminoácidos, é o principal componente tóxico do veneno de abelha *Apis mellifera*. Embora seja solúvel em água, quando na forma de monômero ou tetrâmero, este polipeptídeo se integra rapidamente às membranas e rompe a bicamada fosfolipídica. Segundo os autores, provavelmente pela ação da melitina, haja um aumento da atividade da fosfolipase A_2 , desencadeando inúmeros efeitos sobre as células vivas. Este veneno é utilizado no tratamento de muitas doenças como, por exemplo, artrite [11], bursite, tendinite, herpes zoster, esclerose múltipla, feridas, gota, queimaduras e infecções [12]. Além disso, há estudos que indicam que o veneno de abelha pode inibir a proliferação de células cancerosas [13, 14].

Huh et al. [15] demonstraram que o veneno de abelha é capaz de inibir a angiogênese pela regulação da VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e VEGF-2 em câncer de pulmão (Lewis Lung Cancer-LLC cells), bem como suprimir o crescimento destas células e atrasar a disseminação metastática. Como o veneno de *A. mellifera* é uma rica fonte de diversas substâncias com diversas funções biológicas e com potencial farmacológico, o objetivo do presente trabalho foi verificar se o veneno bruto destes himenópteras apresenta algum potencial antígeno-tóxico e antimutagênico.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material Biológico

2.1.1. Cultura de células humanas

Células HepG2 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC No HB 8065, Rockville, MD) e foram utilizadas para o ensaio do MTT, ensaio do cometa e teste do micronúcleo.

2.1.2. Veneno de *Apis mellifera*

O veneno liofilizado da abelha *A. mellifera* foi obtido junto ao Centro de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro, Brasil.

2.2. Métodos

2.2.1. Cultura de células HepG2

As células foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm² em 5mL de meio MEM (Meio Essencial Mínimo – Cultilab), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de CO₂ (5%), até atingirem confluência. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem celular é de aproximadamente 24 horas.

2.2.2. Teste do MTT

O teste do MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - CAS n. 298-93-1, Sigma) foi realizado com células HepG2, de acordo com o protocolo de Mosmann [16], com algumas modificações. Em cada poço de uma placa de 96 poços, foram

semeadas $2,34 \times 10^4$ células. Após incubação por 24 horas para estabilização das células, o meio foi retirado e adicionado 200uL de meio de cultura (sem soro) no controle negativo (CN), meio de cultura sem soro mais Triton X-100 a 1% no controle positivo (CP) e meio de cultura sem soro mais os tratamentos (diferentes concentrações do veneno de abelha), permanecendo aí por um período de 3 horas. Posteriormente, os tratamentos foram retirados e adicionados 150uL de solução de 5mg/mL de MTT. A placa foi incubada por 4h, em estufa a 37° C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada e foi adicionado, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram então lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific) em filtros de 540nm. A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

2.2.3. Ensaio do cometa com células HepG2

O ensaio do cometa foi realizado para avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico dos venenos de abelha e foi feito de acordo com o protocolo descrito por Singh et al. [17] e Tice et al. [18], com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata/tratamento.

Tanto para o ensaio de genotoxicidade como para o de antigenotoxicidade, 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25cm². Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37° C, 5% CO₂ em atmosfera úmida, para um período de estabilização. Passado este tempo, foram feitas duas avaliações, uma para a avaliação da genotoxicidade, onde as células foram expostas a diferentes concentrações do veneno de abelha por 3 horas, e outra para a avaliação da antigenotoxicidade, onde foram realizados 4 tipos diferentes de tratamento:

- pré-tratamento, onde as células foram expostas às diferentes concentrações do veneno de abelha por 3 horas. Após este tempo, o meio foi retirado e as células expostas a meio de cultura novo contendo metilmetano sulfonato (MMS, CAS No 66-27-3), na concentração de 4×10^{-2} M, por mais 3 horas;

- pós-tratamento: neste teste as células ficaram expostas ao MMS (4×10^{-2} M) por 3 horas, o meio foi retirado e as células foram expostas a meio de cultura novo contendo diferentes concentrações do veneno de abelha, por mais 3 horas;

- tratamento simultâneo: as células foram expostas simultaneamente ao MMS (4×10^{-2} M) e às diferentes concentrações do veneno de abelha por 3 horas;

- tratamento simultâneo com incubação: o MMS (4×10^{-2} M) foi previamente incubado juntamente com os venenos de abelha, por 1 hora à 37° C. Após este período de incubação, as células foram expostas, por 3 horas, a esta mistura.

Além destes tratamentos, as células também foram expostas a um controle negativo (CN, 50 μ L de PBS) e controle positivo (CP, MMS, 4×10^{-2} M).

Após os tempos de tratamento, tanto para avaliação de genotoxicidade como de antigenotoxicidade, as células foram coletadas. Após a obtenção da suspensão celular, foi realizado o teste de viabilidade celular com Azul de tripan (Gibco), de acordo com a metodologia descrita por Salvadori et al. [19], onde 5 μ L da suspensão celular foram misturadas com 5 μ L de azul de tripan, seguida de uma contagem de 100 células, para a observação da quantidade de células coradas em branco (vivas) e em azul (mortas).

Após a contagem da viabilidade celular, 20 μ L da suspensão celular obtida foram misturadas a 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 37° C. Em seguida, esta suspensão celular foi disposta em uma lâmina previamente revestida com agarose normal e recoberta com lamínula. Após breve período de solidificação a 4° C (15 minutos), as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de lise estoque – NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM e ~8g de NaOH, pH=10), no escuro, a 4° C, por, no mínimo, 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e recobertas com tampão alcalino (NaOH 300mM+EDTA 1mM, pH>13), deixadas aí por 20 minutos para estabilização. Após este período, foram submetidas a uma eletroforese a 39V, 300mA (~ 0,8V/cm) por 20 minutos. Decorrido este tempo de eletroforese, as lâminas foram retiradas e neutralizada em tampão Tris (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e armazenadas à 4° C, até a realização das análises. As lâminas foram coradas com 50 μ L de solução de GelRed® (15 μ L de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) e analisadas, imediatamente após a sua coloração. Foram analisados, em microscopia de epifluorescência Leica, aumento de 400x, filtro B - 3⁴ (excitação: λ =420nm-490nm, barreira: λ =520nm), 100 nucleóides por lâmina, totalizando 600 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados visualmente e alocados em uma das quatro classes (0, 1, 2, 3) de acordo com a migração dos fragmentos como segue:

classe 0, sem cauda; classe 1, cauda pequena com tamanho menor que o diâmetro da cabeça (núcleo); classe 2, tamanho da cauda igual ao diâmetro da cabeça ou até duas vezes o diâmetro da cabeça e classe 3, cauda maior que o diâmetro da cabeça [20].

O escore total foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo dano da classe, de acordo com a fórmula: $\text{Escore total} = (0 \times n_1) + (1 \times n_2) + (2 \times n_3) + (3 \times n_3)$, onde n = número de células em cada classe analisada. Deste modo, o escore total pode variar entre 0 a 300. A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

2.2.4. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN)

O ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN) foi utilizado para se avaliar a mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes concentrações do veneno de abelha e foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi [21], com algumas modificações.

Tanto para o ensaio de mutagenicidade como para o de antimutagenicidade, 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25cm^2 . Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C , 5% CO_2 em atmosfera úmida, para um período de estabilização. Passado este tempo, duas avaliações foram feitas, uma para a avaliação da mutagenicidade, onde as células foram expostas à diferentes concentrações do veneno de abelha por 3 horas e outra para a avaliação da antimutagenicidade, onde foram realizados 4 tipos diferentes de tratamento, conforme já descrito para o teste do cometa.

Após os tratamentos, tanto para avaliação de genotoxicidade e antigenotoxicidade, as células foram lavadas com PBS, o meio foi trocado e foi adicionada (concentração final de $3 \mu\text{g/mL}$) à cultura citocalasina B. As células foram incubadas por mais 28 horas, coletadas, tratadas com solução hipotônica (citrato de sódio 1%) e fixadas com formol (40%) e etanol-ácido acético (3:1). As lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos. Foram contadas 2.000 células binucleadas por réplica, sendo contabilizados os micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares [22].

A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ensaio do MTT

O ensaio do MTT é um ensaio de citotoxicidade em que se avalia a quantidade de células viáveis. Somente as células viáveis são capazes de converter o sal MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) e, uma vez que o sal é convertido dentro da célula, ele não consegue atravessar as membranas celulares acumulando-se em seu interior sob a forma de cristal insolúvel de coloração arroxeada [23]. A quantidade de células viáveis é medida por espectrofotometria, onde quanto maior a absorbância observada maior a quantidade de células viáveis.

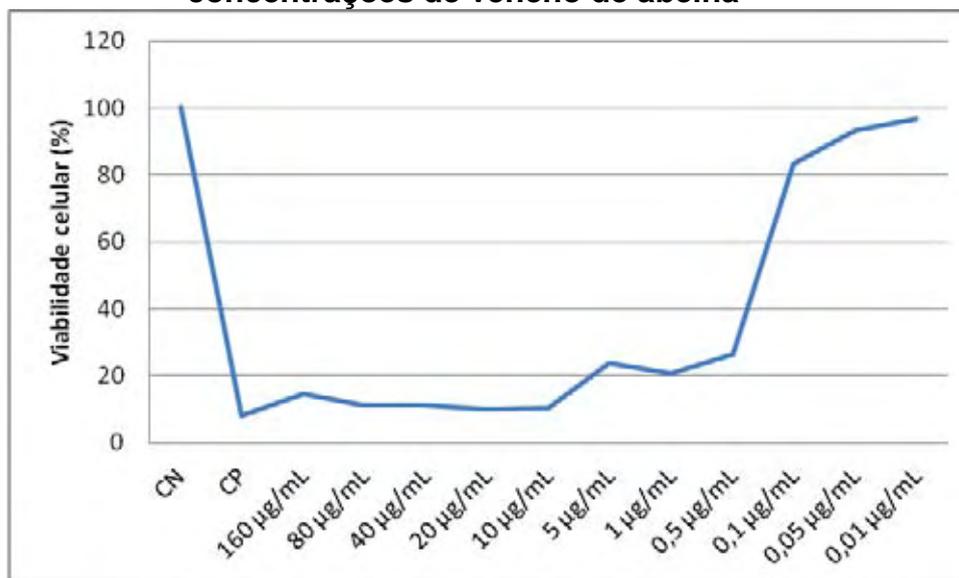
Para o ensaio do MTT, foram testadas as concentrações do veneno de abelha: 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL e 0,01 µg/mL. Os resultados para o ensaio do MTT estão reunidos na Tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade celular referentes ao ensaio colorimétrico do MTT em células HepG2 expostas a diferentes concentrações do veneno de abelha.

Tratamentos	Viabilidade%(média±DP)
CN	100±0,145
CP	8±0,002*
160 µg/mL	14,7±0,008*
80 µg/mL	11±0,003*
40 µg/mL	11±0,003*
20 µg/mL	9,94±0,002*
10 µg/mL	10,21±0,007*
5 µg/mL	23,61±0,024*
1 µg/mL	20,6±0,002*
0,5 µg/mL	26,6±0,01*
0,1 µg/mL	83,3±0,081
0,05 µg/mL	93,3±0,084
0,01 µg/mL	96,6±0,04

DP= desvio padrão; CN=controle negativo; CP=controle positivo. Valores seguidos de *são estatisticamente significativos com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p < 0.05$).

Figura 1. Viabilidade (%) de células HepG2 expostas à diferentes concentrações de veneno de abelha



CN=controle negativo; CP=controle positivo; 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,01 µg/mL =concentrações testadas do veneno de *Apis mellifera*.

Pelos resultados obtidos, observa-se que quase todas as concentrações testadas foram altamente citotóxicas, induzindo a morte de uma grande quantidade de células. As concentrações de 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL e 0,01 µg/mL não foram estatisticamente significativas, com relação ao controle negativo, após um período de 3 horas, e apresentaram viabilidade igual a 83,3%, 93,3% e 96,6%, respectivamente. Como os ensaio de cometa e o teste do micronúcleo necessitam de uma viabilidade celular superior a 80%, estas três concentrações (0,1µg/mL, 0,05µg/mL e 0,01µg/mL) foram escolhidas para realizar os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade.

3.2. Ensaio do cometa

Pelos resultados obtidos com o ensaio do MTT, foram selecionadas as concentrações de 0,1, 0,05 e 0,01 µg/mL do veneno de abelha, para a avaliação inicial da genotoxicidade desta substância. Estas concentrações apresentaram potencial genotóxico, como pode ser observado na Tabela 2. Como o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antigenotóxico do veneno, foram testadas as menores concentrações do veneno de abelha (1ng/mL, 100pg/mL, 10pg/mL, 1pg/mL e 0,1pg/mL), até se encontrar concentrações que não induzissem genotoxicidade. Os resultados estão reunidos na Tabela 2.

Tabela 2. Ensaio do cometa em células HepG2 expostas a diferentes concentrações do veneno de abelha.

Tratamentos	Número de células em cada classe do cometa				Escore de dano (Média±DP)	Viabilidade celular (%)
	Categorias de migração (Média±DP)					
	0	1	2	3		
CN	93,33±1,5	0,5±0,54	2±0,63	4,16±0,75	17±3,28	95
CP	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	86
0,1 µg/mL	3,16±2,64	46,16±16,5	16,83±7,41	33,83±18,9	186,33±30,33*	95
0,05µg/mL	5,83±2,78	35±15,54	19,83±4,53	41±15,70	197,66±33,23*	95
0,01 µg/mL	36,83±8,58	18,66±9,41	7,5±3,83	35±6,51	138,66±18,90*	90,67
1ng/mL	53,16±8,3	19,5±11,57	7,16±1,17	20,16±7,41	94,33±17,4*	97
100pg/mL	62,83±3,48	16±3,40	6,33±0,81	14,83±1,83	73,16±6,36*	95,33
10pg/mL	86,33±1,47	6,66±1,21	4±0,89	3,16±0,75	24,16±1,83	93,33
1pg/mL	89,66±1,86	4,33±2,06	3,16±0,75	2,83±1,47	19,16±2,63	92,67
0,1pg/mL	91,33±0,52	2,5±0,83	2,66±0,51	3,5±0,83	18,33±1,63	93

CN=controle negativo, CP=controle positivo, DP=desvio padrão. Escore de dano: 0 = sem dano; 300 = dano máximo; * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p<0,05$).

Pelos resultados obtidos, observou-se que as concentrações de 10pg/mL, 1pg/mL e 0,1pg/mL não foram estatisticamente significativas, com relação ao controle negativo, e, não induzindo assim genotoxicidade. Assim estas concentrações foram selecionadas, para a avaliação do potencial antigenotóxico do veneno de abelha. Os dados para a avaliação antigenotóxica estão na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaio do cometa em células HepG2 expostas a diferentes tratamentos com veneno de abelha

Tratamentos	Número de células em cada classe do cometa				Escore de dano (Média±DP)	Viabilidade celular (%)	
	Categorias de migração (Média±DP)						
	0	1	2	3			
CN	93,33±1,5	0,5±0,54	2±0,63	4,16±0,75	17±3,28	95	
CP	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	86	
10 pg/mL	PT	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	92
	PosT	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	90,67
	TS	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	93,33
	TSI	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	95
1 pg/mL	PT	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	97
	PosT	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	95,67
	TS	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	94
	TSI	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	96,33
0,1 pg/mL	PT	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	95
	PosT	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	92,33
	TS	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	93,67
	TSI	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0*	97,33

PT: pré-tratamento, PosT: pós-tratamento, TS: tratamento simultâneo; TSI: tratamento simultâneo com incubação, DP=desvio padrão. Escore de dano: 0=sem dano; 300=dano máximo; * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p<0,05$).

Apesar das concentrações de 10 pg/mL, 1 pg/mL e 0,1 pg/mL não induzirem genotoxicidade, quando ministradas com o metilmetano sulfonato (MMS, reconhecido agente genotóxico), observou-se que todos os tratamentos (pós e pré e os tratamentos simultâneos com ou sem incubação) apresentaram os mais altos escores de danos, indicando que o veneno de abelha não foi eficiente para inibir os danos induzidos pelo MMS.

3.3. Teste do MN com bloqueio da citocinese (CBMN)

As mesmas concentrações usadas para o ensaio do cometa foram também usadas para se avaliar a mutagenicidade do veneno de abelha (0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,01 µg/mL). Assim, como observado no ensaio do cometa, as três concentrações iniciais se mostraram mutagênicas e os dados estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese com células HepG2 expostas a diferentes concentrações do veneno de abelha

Tratamentos	MN (Média±DP)	Broto (Média±DP)	Ponte (Média±DP)
CN	18±3,06	6,33±1,52	0,66±1,15
CP	56±4,58*	19±2,64*	3,66±0,57
0,1 µg/mL	46,66±5,5*	17,66±4,04*	5,66±2,08
0,05µg/mL	50,33±6,8*	17,66±2,51*	3±1
0,01 µg/mL	40,33±4,04*	15±2*	2,33±1,52
1ng/mL	36±1*	16±1*	4,66±3,21
100pg/mL	32,66±0,57*	12,33±1,52*	4±2
10pg/mL	23,66±2,08	10,33±1,52	2,33±1,52
1pg/mL	24±1	10±1,73	3±1,73
0,1pg/mL	23±1,73	9,33±1,52	3,33±0,57

CN=controle negativo; CP=controle positivo; MN=micronúcleo; DP=desvio padrão, *=estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p<0,05$).

Foram testadas as concentrações mais baixas de veneno de abelha (1ng/mL, 100pg/mL, 10 pg/mL, 1pg/mL e 0,1pg/mL), para se encontrar as concentrações que não apresentassem potencial mutagênico. Como apresentado na tabela 4, estas concentrações foram as de 10 pg/mL, 1pg/mL e 0,1pg/mL, sendo então utilizadas para se avaliar o potencial antimutagênico sobre o metilmetano sulfonato (MMS). Os resultados de avaliação de antimutagenicidade do veneno de abelha estão reunidos na Tabela 5.

Tabela 5. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese em células HepG2 expostas a diferentes tratamentos com veneno de abelha

Tratamentos	MN (Média±DP)	Broto (Média±DP)	Ponte (Média±DP)
CN	18±3,06	6,33±1,52	0,66±1,15
CP	56±4,58*	19±2,64*	3,66±0,57
10pg/mL	PT	62,66±3,05*	19,66±3,78*
	PosT	60,33±1,52*	18,33±2,3*
	TS	62,66±7,09*	21±1,73*
	TSI	57,33±6,65*	19±0*
1pg/mL	PT	76±5*	22,33±2,08*
	PosT	73,33±9,29*	22,33±2,51*
	TS	73,66±9,07*	24,33±4,04*
	TSI	64,33±5,85*	21,33±7,02*
0,1pg/mL	PT	67,66±5,03*	23,33±4,16*
	PosT	87,66±4,16*	24,33±2,88*
	TS	82,66±3,78*	26±1*
	TSI	68,33±9,29*	25±2,64*

PT: pré-tratamento, PosT: pós-tratamento, TS: tratamento simultâneo; TSI: tratamento simultâneo com incubação, CN=controle negativo; CP=controle positivo; MN=micronúcleo; DP=desvio padrão, * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p<0,05$).

Assim como observado para o ensaio do cometa, observou-se que apesar das três concentrações não serem capazes de induzir mutagenicidade nas células

HepG2, elas não conseguiram inibir e/ou diminuir os danos causados pelo MMS, indicando que nenhuma das três concentrações testadas apresentam potencial antimutagênico. Além disso, observou-se um aumento no número de micronúcleos, quando o MMS foi associado às 3 diferentes concentrações do veneno de *Apis mellifera*, indicando que possivelmente o veneno de abelha possa ainda potencializar a ação do MMS.

4. Discussão e Conclusão

As células HepG2 mantém muitas das funções de células normais de fígado [24], por expressar diferentes enzimas metabolizadoras de xenobióticos [25, 26]. Por isso, estas células têm sido amplamente utilizadas e recomendadas para detectar a ação de mutágenos e anti-mutágenos [21, 26, 27].

Nossos resultados são discordantes com os observados por Varanda et al. [28], que observaram, pelo teste de Ames, que o veneno de abelha, nas concentrações 0,01, 0,02, 0,04 e 0,05 μ L, apresentaram efeito antimutagênico contra daunomicina e 4 nitro-o-fenilendiamina (NPD). Uma possível explicação para isso seria a forma diferente de administração do veneno entre os dois trabalhos e os diferentes agentes mutagênicos testados (MMS neste trabalho e daunomicina no de Varanda et al.[28]). No nosso estudo, o veneno de abelha foi liofilizado, e, por isso, as enzimas proteolíticas presentes no veneno de abelha não puderam destruir proteínas com potencial genotóxico e mutagênico. Já no estudo conduzido por Varanda et al. [28], o veneno foi coletado em tubos capilares e, posteriormente, diluídos em água destilada estéril (1 μ L de veneno/mL de água), para ser usado nos ensaios. Este procedimento pode ter levado a degradação de proteínas ativas, como as fosfolipases e a melitina.

Nossos resultados estão em concordância com Lee et al [11], onde estes autores verificaram que o veneno de abelha aumentou a frequência de micronúcleos em células HL-60 (célula de leucemia promielocítica humana), mas não em linfócitos humanos, embora a fragmentação nuclear tenha sido observada nos dois tipos celulares. O veneno de abelha induziu a formação de bolhas na membrana celular dos linfócitos humanos. Em outro estudo realizado por Garaj-Vrhovac e Gajski [29], os autores avaliaram o efeito do veneno de abelha em linfócitos humanos, pelo teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese e pelo ensaio do cometa. Os autores

verificaram que as altas concentrações do veneno de abelha (100µg/mL) podem induzir instabilidade celular.

Um dos possíveis responsáveis pela genotoxicidade e mutagenicidade do veneno de abelha, observada neste trabalho para as células HepG2, pode ser a melitina, que é o componente mais abundante do veneno de abelha [8] e também o de maior toxicidade [10]. Esta pequena proteína possui atividade hemolítica e atua como um detergente, desestruturando e hidrolisando as membranas celulares, liberando aminas biogênicas e potássio. Além disso, esse peptídeo pode alterar a permeabilidade e induzir a morte celular, ativar a fosfolipase A₂ [30, 11] e aumentar a atividade da calpaina, uma enzima que se mostrou associada à atividade da fosfolipase em ensaios com hepatócitos, quando essas células foram testadas durante anóxia [31].

Outro composto que é capaz de interferir na estrutura de membranas celulares é a fosfolipase A₂ (PLA₂), uma enzima que pode hidrolisar e digerir os componentes da membrana celular e, conseqüentemente, desestruturar a integridade da bicamada lipídica [32].

A melitina, juntamente com a PLA₂, acabam desestruturando membranas biológicas, fazendo com que as células fiquem mais susceptíveis a ação de outros compostos do veneno de abelha capazes de interagir com o DNA da célula, causando os danos genéticos observados.

Além disso, no estudo realizado por Tu et al. [33], os autores verificaram que a concentração intracelular de cálcio aumentou rapidamente após a adição de veneno de abelha. Segundo Duke et al. [34], esse aumento pode estar relacionado com a ação da melitina, que leva a mudanças na homeostase de Ca²⁺, em células de mamíferos, e inicia a morte celular programada ou necrose em diversos tipos celulares [35,36]. A oscilação na concentração de Ca²⁺ citosólico livre é conhecido por ativar as endonucleases dependentes de Ca²⁺/Mg²⁺, que quebram as fitas de DNA [34], podendo induzir os danos observados no ensaio do cometa ou levar à indução de mutações. Outro efeito desta oscilação de Ca²⁺ citosólico livre pode estar relacionado com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio intracelular e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo celular [37], que leva à morte da célula ou ainda, pela sua interação com a molécula de DNA, causando mutações [38].

O veneno de *A. mellifera* tem sido avaliado como um agente potencialmente anticarcinogênico e seu efeito citotóxico, em células de câncer, parece estar

relacionado com a ativação da fosfolipase A₂, caspase e MMP (metaloproteinases da matriz), que acabam destruindo as células de câncer. Por este motivo, esse composto tem sido sugerido como um importante mecanismo para atividade anticarcinogênica [39-44]. Apesar de ser considerado, por alguns autores como um promissor agente anticarcinogênico, o veneno de abelha deve ser usado com cautela, uma vez que foi observado neste estudo que as concentrações não consideradas citotóxicas podem induzir genotoxicidade e mutagenicidade. Além disso, o veneno de abelha parece potencializar a ação de um agente indutor de danos genéticos (MMS), o que demanda em uma maior cautela ao se administrar esta substâncias em pacientes portadores de câncer, pois, de maneira geral, esses pacientes recebem administração de quimioterápicos que podem ter efeito citotóxico e genotóxico sobre as células normais, podendo se caracterizar em um perigo a mais para esses indivíduos. Outro fator a ser considerado, seria também o perigo para os seres humanos não submetidos à quimioterapia, uma vez que estamos expostos a diversos compostos que são capazes de induzir danos no DNA.

5. Agradecimentos

As autoras agradecem a CAPES e Convênio-REPLAN: 1100.0067969.11.4 pelo apoio financeiro e ao Dr. Osmar Malaspina do Centro de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro, Brasil, que gentilmente cedeu o veneno liofilizado da abelha *Apis mellifera*, para o desenvolvimento desta pesquisa.

6. References

- [1] W. Liao, M.A. McNutt, W.G. Zhu, W.G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48(2009) 46-53.
- [2] L.R. Ferguson. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* 307 (1994) 395-410.
- [3] F. Uenobe, S. Nakamura, M. Miyazawa. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat. Res.* 373 (1997) 197-200.
- [4] M. Ferrer, A. Sánchez-Lamar, J.J. Fuentes, J. Barbé, M. Llagostera. Studies on the antimutagenesis of *Plyllanthys orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. *Mutat. Res.* 498 (2001) 99-105.

- [5] R. Cariño-Cortés, A. Hernández-Ceruelos, J.M. Torres-Valencia, M. González-Avila, M. Arriaga-Alba, E. Madrigal-Bujaidar. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. *Toxicol. In Vitro* 21 (2007), 691-697.
- [6] B. Mikolić, D. Mitić-Ćulafić, B. Vulaković-Gačić, J. Knežević-Vukčević. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 2035-2045.
- [7] M. Arriaga-Alba, J.J. Blasco, N.J. Ruíz-Pérez, J. Sánchez-Navarrete, R. Rivera-Sánchez, M. González-Avila. Antimutagenicity mechanisms of the *Rhoeo discolor* ethanolic extract. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63 (2011), 243-248.
- [8] E. Habermann. Bee and wasp venom: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed, *Science* 177 (1972) 314–322.
- [9] W.R. Lariviere, R. Melzack. The bee venom test: a new tonic-pain test. *Pain* 66 (1996) 271-277.
- [10] T.C. Terwilligert, D. Eisenberg. The Structure of Melittin. II. Interpretation of the structure. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 6016-6022.
- [11] Y.J. Lee, S.J. Kang, B.M. Kim, H.D. Woo, H.W. Chung. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions* 169(2007) 189-197.
- [12] J. Chen, W.R. Lariviere. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A doyble-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92 (2010) 151-183.
- [13] X. Liu, D. Chen, L. Xie, R. Zhang. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo, *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 1083–1089.
- [14] N. Oršolić, L. Šver, S. Verstovšek, S. Terzić, I. Bašić. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* by bee venom. *Toxicol* 41 (2003) 861–870.
- [15] J.E. Huh, Y.H. Baek, M.H. Lee, D.Y. Choi, D.S. Park, J.D. Lee. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumour-bearing-mice. *Cancer Letters* 292 (2010) 98-110.
- [16] T. Mosmann. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55-63.

- [17] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [18] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(2000) 206-221.
- [19] D.M.F. Salvadori, L.R. Ribeiro, M. Fenech. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. IN: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds.). *Mutagênese Ambiental*, Canoas: Ed. ULBRA (2003) 201-223.
- [20] J. Rigonato, M.S. Mantovani, B.Q. Jordão, B.Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.*,28 (2005) 464-468.
- [21] A.T. Natarajan, F. Darroudi, F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis.* 6 (1991) 399-403.
- [22] M. Fenech, M.F. Crott. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504 (2002) 131-136.
- [23] G. Fotakis, J.A. Timbrell. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 171-177.
- [24] B.B. Knowles, C.C. Howe, D.P. Aden. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209(1980) 497-499.
- [25] H. Doostdar, M.H. Grant, W.T. Melvin, C.R. Wolf, M.D. Burke. The effects of inducing agents on cytochrome P450 and UDP-glucuronyltransferase activities in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem. Pharmacol.* .46 (1993) 629-635.
- [26] S. Knasmüller, W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, V. Mersch-Sundermann, G. Williamson, G. Hietsch, T. Langer, F. Darroudi, A.T. Natarajan. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat. Res.* 402 (1998) 185-202.

- [27] I. Valentin-Severin, L. Le Hegarat, J.C. Lhuguenot, A.M. Le Bon, M.C. Chagnon. Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 536 (2003) 79-90.
- [28] E.A. Varanda, R. Monti, D.C. Tavares. Inhibitory Effect of Propolis and Bee Venom on the Mutagenicity of Some Direct- and Indirect-Acting Mutagens. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 19 (1999) 403-413.
- [29] V. Garaj-Vrhovac, G. Gajski, Evaluation of the cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to a high concentration of bee venom *in vitro*. *Arh Hig Rada Toksikol* 60 (2009) 27-34.
- [30] K.T. Fitzgerald, A.A. Flood. Hymenoptera Stings. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 21 (2006) 194-204.
- [31] A.S. Arora, P. de Groen, Y. Emori, G.J. Gores. A cascade of degradative hydrolase activity contributes to hepatocyte necrosis during anoxia. *Am. J. Physiol.* 270 (1996) G238–G245.
- [32] N. Oršolić. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 31 (2012) 173-194.
- [33] W.C. Tu, C.C Wu, H.L. Hsieh, C.Y. Chen, S.L. Hsu. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicol* 52 (2008) 318-329.
- [34] R.C. Duke, R.Z. Witter, P.B. Nash, J.D. Young, D.M. Ojcius, D.M. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *FASEB J.* 8 (1994) 237-246.
- [35] M. Giacomello, I. Drago, P. Pizzo, T. Pozzan. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ* 14 (2007) 1267-1274.
- [36] A.M. Florea, D. Büsselberg. Anti-cancer drugs interference with intracellular calcium signaling. *NeuroToxicology* 30 (2009) 803-810.
- [37] M.T. Grijalba, A.E. Vercesi, S. Schreier. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* 38 (1999) 13279-13287.
- [38] I. Emerit. Reactive Oxygen Species, Chromosome Mutation, and Cancer: Possible Role of Clastogenic Factors in Carcinogenesis. *Free Radical Bio. Med.* 16 (1994) 99-109.

- [39] H. Hu, D. Chen, Y. Li, X. 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 mice *in vivo*. *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 83-89.
- [40] D.O. Moon, S.Y. Park, M.S. Heo, K.C. Kim, C. Park, W.S. Ko, Y.H. Choi, G.Y. Kim. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemia U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int. Immunopharmacol.* 6 (2006) 1796-1807.
- [41] D.O. Moon, S.Y. Park, K.J. Lee, M.S. Heo, K.M. Kim, M.O. Kim, J.D. Lee, Y.H. Choi, G.Y. Kim. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int. Immunopharmacol.* 7 (2007) 1092-1101.
- [42] T. Putz, R. Ramoner, H. Gander, A. Rahm, G. Bartsch, M. Thurnher. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A₂ and phosphatidylinositol-(3-4)-biphosphate. *Cancer Immunol. Immunother.* 55 (2006) 1374-1383.
- [43] S.J. Suh, K.S. Kim, M.J. Kim, Y.C. Chang, S.D. Lee, M.S. Kim, D.Y. Kwon, C.H. Kim. Effects of the bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats. *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 1465-1471.
- [44] D.J. Son, J.W. Lee, Y.H. Lee, H.S. Song, C.K. Lee, J.T. Hong. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics* 115 (2007) 246-270.

Comparação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do veneno de vespa *Polybia paulista*, de abelha *Apis mellifera* e da fosfolipaseA₂

Márcia Miyuki Hoshina¹, Raquel Vaz Hara¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹UNESP, Avenida 24 A, 1515, CP 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.

Artigo a ser submetido para a revista Mutation Research

Resumo

Venenos de Hymenoptera apresentam uma variedade de compostos, sendo a fosfolipase A₂ um dos principais componentes presente em todos os venenos. Estudos prévios demonstraram que o veneno da vespa *Polybia paulista* (VV) e da abelha *Apis mellifera* (VA) apresentam potencial genotóxico e mutagênico. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a fosfolipase A₂ (PLA₂) seria a substância responsável pela genotoxicidade e mutagenicidade observadas para as células expostas aos venenos. Após a realização do teste do MTT, verificou-se que nenhuma das concentrações testadas de PLA₂ (10 µg/mL, 1 µg/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL e 0,1ng/mL) foi citotóxica para células HepG2, sendo então escolhida a concentração de 10 ng/mL de PLA₂ (concentração presente no veneno de abelha) para a realização dos testes de genotoxicidade e mutagenicidade com este organismo teste. Após o ensaio do cometa e do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, observou-se que PLA₂ induziu genotoxicidade e mutagenicidade em células HepG2. Os escores de dano observados para VV foram muito próximos aos da PLA₂, indicando que esta substância pode ser a maior responsável pela genotoxicidade observada para este veneno. Para o VA, foi observado um escore de dano mais alto que o de PLA₂, indicando que, para este veneno, o PLA₂ não é o único indutor de dano. Para o ensaio do micronúcleo e de anormalidades nucleares, somente os dados de micronúcleo (MN) foram estatisticamente significativos com relação ao controle negativo, sendo que os valores mais altos foram registrados para VA, seguido de VV e PLA₂. Os altos valores observados para VA podem ser explicados pela ação aditiva da melitina (composto mais abundante do veneno de *Apis mellifera*). A genotoxicidade e mutagenicidade da PLA₂ podem ser explicadas tanto pelo fato de que esta substância gera espécies reativas de oxigênio, que interagem com a molécula de DNA, causando os danos observados nas células HepG2, como por romper as ligações lipídicas das membranas biológicas, formando poros nessas estruturas, por onde podem entrar outras substâncias que interagem também com o material genético da célula.

Palavras-chave: célula HepG2, ensaio do MTT, teste do micronúcleo, ensaio do cometa

1. Introdução

Venenos de Hymenoptera são compostos por uma série de substâncias, variando desde compostos de baixo peso molecular à proteínas, sendo que muitas destas proteínas possuem propriedades enzimáticas [1, 2].

Estudos preliminares realizados pelos autores deste trabalho mostraram que veneno de abelha *Apis mellifera* e de vespa *Polybia paulista* induzem alterações no material genético de células HepG2. Estudos realizados por Lee et al. [3] e Garaj-Vrhovac e Gajski [4] também descreveram que o veneno de *Apis mellifera* produz alterações no material genético de células humanas (cultura de linfócitos e células HL-60, respectivamente) expostas ao veneno.

Segundo Przybilla e Ruëf [2], os efeitos citotóxicos e neurotóxicos dos venenos de Hymenoptera são principalmente atribuídos aos peptídeos e as fosfolipases, enquanto que as hialuronidases atuam conjuntamente com aminas biogênicas como “fator de difusão”. As fosfolipases (PLAs) são relativamente comuns nos venenos de Hymenoptera, ocorrendo, segundo Abe et al. [5], nas formas de PLA (1 e 2) e PLB. A fosfolipase A₁ e a fosfolipase A₂ catalisam hidrólises específicas de ligações ésteres na posição C1 e C2, respectivamente, de 1,2-diacil-3-sn-glicerofosfolídeos, formando ácidos graxos livres. Estas substâncias são capazes de desorganizar os lipídeos de diferentes membranas biológicas, levando a formação de poros e/ou lise celulares [6, 7].

De acordo com o exposto acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da fosfolipase A₂ induzir danos no material genético de células HepG2 mantidas em cultura e avaliar se os danos observados no DNA dessas células expostas aos venenos de *A. mellifera* e de *P. paulista* são causados pela ação da fosfolipase.

2. Material e métodos

2.1. Material

2.1.1. Cultura de células humanas

Células HepG2 (células de Hepatocarcinoma Humano) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC No HB 8065, Rockville, MD) e foram utilizadas para realização do ensaio do MTT, ensaio do cometa e teste do micronúcleo (MN).

2.1.2. Substâncias químicas utilizadas

A fosfolipase A₂ utilizada neste experimento (CAS No. 9001-84-7, Sigma) foi derivada de veneno de abelha. Como controle positivo foi utilizada a substância metilmetano sulfonato (MMS, CAS No 66-27-3, Sigma), concentração de 4×10^{-2} M. Para o ensaio do MTT foi utilizado o sal Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT - CAS n. 298-93-1, Sigma).

2.1.3 Venenos

O veneno liofilizado da abelha *A. mellifera* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Osmar Malaspina, do Centro de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro.

Vespas da espécie *P. paulista* foram gentilmente cedidas pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro, para serem processadas para a extração do veneno, como segue: após a captura de ninhos, os insetos foram imediatamente congelados a -80°C , para serem posteriormente dissecados. Para a obtenção do veneno necessário para os ensaios, foram extraídos, com auxílio de pinças, 1160 glândulas. Os glândulas de veneno foram cuidadosamente lavados, perfurados e agitados suavemente em solução contendo Inibidor de Protease 1 mM (PMSF- Floureto de Sulfonil Metil Fenil) e centrifugados a 8000 rpm, por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi usado como extrato bruto do veneno e posteriormente foi liofilizada em liofilizador “Centrivap Concentrator” (Labconco), acoplado a um condensador de solvente “Centrivap Ultra Low Cold Trap” (Labconco).

2.2. Métodos

2.2.1. Cultura de células HepG2

As células HepG2 foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm^2 em 5mL de meio MEM (Meio Essencial Mínimo – Cultilab), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de CO₂ (5%), até atingirem confluência. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem celular é de aproximadamente 24 horas.

2.2.2. Teste do MTT

A citotoxicidade da fosfolipase A₂ foi determinada neste estudo pelo ensaio do MTT. A citotoxicidade do veneno de vespa *P. paulista* e da abelha *A. mellifera* foram determinados previamente pelos autores, em outro estudo, onde foram estabelecidos que valores abaixo de 10 µg/mL de *P. paulista* e valores abaixo de 0,1µg/mL de *A. mellifera* não se mostraram citotóxicos (dados ainda não publicados).

O teste do MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* - CAS n. 298-93-1, Sigma), realizado com células HepG2, foi desenvolvido de acordo com o protocolo de Mosmann [8](1983), com algumas modificações. O teste foi feito em placa de 96 poços, onde foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células por poço. A placa foi incubada por 24 horas, para estabilização das células e, após este tempo, o meio foi retirado dos poços, sendo adicionado 200 uL de: meio de cultura sem soro no controle negativo (CN); meio de cultura sem soro mais Triton X-100 a 1% no controle positivo (CP); e meio de cultura sem soro mais os tratamentos (veneno de vespa, abelha e PLA₂) nos testes com os venenos, permanecendo nas placas por um período de 3 horas. Posteriormente, os tratamentos foram retirados e adicionados 150 ul de solução de 5 mg/mL de MTT. A placa foi incubada, por 4h, em estufa a 37° C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada e foi adicionado, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram então lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific) em filtros de 540nm. A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

2.2.3. Ensaio do cometa com células HepG2

O ensaio do cometa, realizado para avaliar o potencial genotóxico dos venenos de vespa, de abelha e da PLA₂, foi feito de acordo com o protocolo descrito por Singh et al. [9](1988) e Tice et al. [10](2000) com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata/tratamento. Para isso, 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm², incubadas por 24 horas em estufa a 37° C, 5% CO₂ em atmosfera úmida, para um período de estabilização.

Posteriormente, as células foram expostas aos venenos de vespa, de abelha e a PLA2 por 3 horas. Além destes tratamentos, também foram desenvolvidos os ensaios de controle negativo (CN, 50 μL de PBS) e controle positivo (CP, MMS, 4×10^{-2} M). Após os tempos de tratamento, as células foram coletadas, e com a suspensão celular obtida foi realizado o teste de viabilidade celular com Azul de tripan (Gibco), onde 5 μL da suspensão celular foram misturadas com 5 μL de azul de tripan, de acordo com a metodologia descrita por Salvadori et al. [11]. Foram contadas 100 células por ensaio, observando a quantidade de células coradas em branco (vivas) e as em azul (mortas).

Após a contagem da viabilidade celular, 20 μL da suspensão celular obtida foram misturadas a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C . Em seguida, esta suspensão celular foi disposta em uma lâmina previamente revestida com agarose normal e recoberta com lamínula. Após breve período de solidificação a 4°C (15 minutos), as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de lise estoque – NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e ~8g de NaOH, pH=10), no escuro, a 4°C , por, no mínimo, 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e recobertas com tampão alcalino (NaOH 300 mM+EDTA 1 mM, pH>13) e deixadas aí por 20 minutos para estabilização. Após este período, foram submetidas a uma eletroforese a 39 V, 300 mA (~ 0,8 V/cm) por 20 minutos. Decorrido este tempo de eletroforese, as lâminas foram retiradas e neutralizada em tampão Tris (pH 7,5) e fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e armazenadas à 4°C , até a realização das análises. As lâminas 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 analisadas imediatamente após a sua coloração. Foram analisados, em microscopia de epifluorescência Leica, aumento de 400x, filtro B - 3⁴ (excitação: $\lambda=420$ nm-490 nm, barreira: $\lambda=520$ nm), 100 nucleóides por lâmina, totalizando 600 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados visualmente e alocados em uma das quatro classes (0, 1, 2, 3) de acordo com a migração dos fragmentos como segue: classe 0, sem cauda; classe 1, cauda pequena com tamanho menor que o diâmetro da cabeça (núcleo); classe 2, tamanho da cauda igual ao diâmetro da cabeça ou até duas vezes o diâmetro da cabeça e classe 3, cauda maior que o diâmetro da cabeça [12].

O escore total foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo dano da classe, de acordo com a fórmula: $\text{Escore total} = (0 \times n_1) + (1 \times n_2) + (2 \times n_3) + (3 \times n_3)$, onde n = número de células em cada classe analisada. Deste modo, o escore total pode variar entre 0 a 300. A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

2.2.4. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Para se avaliar a mutagenicidade do veneno de vespa, de abelha e da PLA2 foi utilizado o ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN, de acordo com o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi [13] com algumas modificações. Para os ensaios, 5×10^5 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm^2 . Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C , 5% CO_2 em atmosfera úmida, para um período de estabilização.

A seguir, as células foram expostas ao veneno de vespa, de abelha e a PLA2 por 3 horas. Após os tempos de tratamento, as células foram lavadas com PBS, o meio foi trocado e foi adicionada citocalasina B (concentração final de $3 \mu\text{g/mL}$). As células foram então incubadas por mais 28 horas, coletadas, tratadas com solução hipotônica (citrato de sódio 1%) e fixadas com formol (40%) e etanol-ácido acético (3:1). As lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos.

Foram contadas 2.000 células binucleadas por réplica, sendo contabilizados os micronúcleos, as pontes nucleoplasmáticas e os brotos nucleares [14]. A análise de significância dos resultados foi feita pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ensaio do MTT

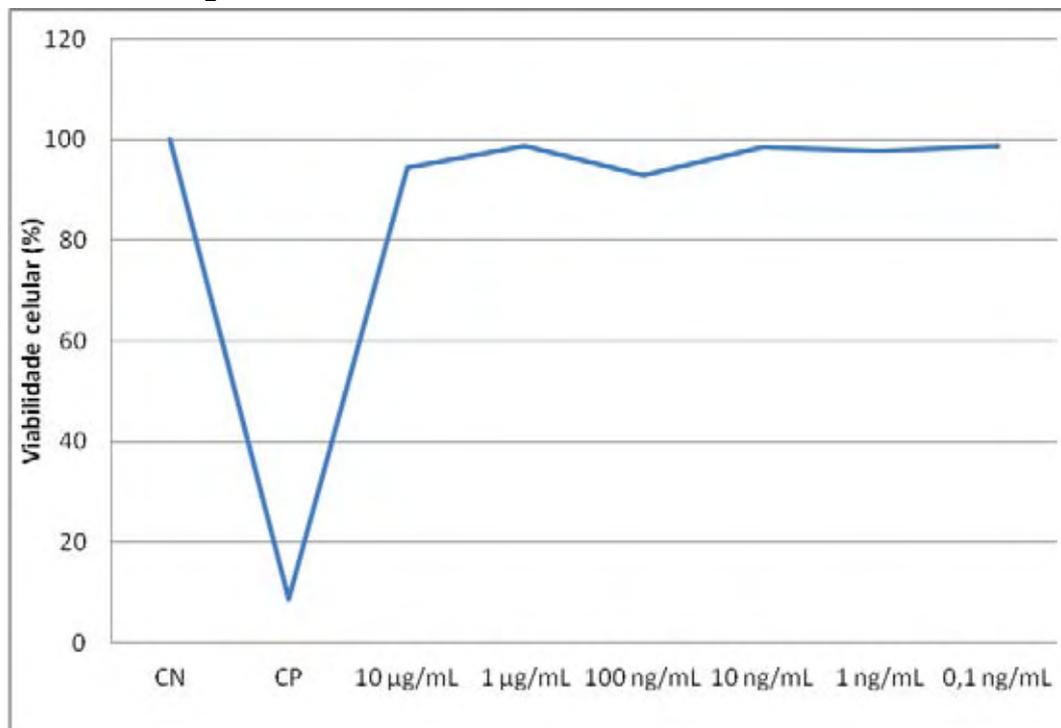
Os resultados do teste do MTT, realizados com as concentrações de $10 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$, 100 ng/mL , 10 ng/mL , 1 ng/mL e $0,1 \text{ ng/mL}$ de PLA₂, estão reunidos na Tabela 1, Figura 1.

Tabela 1. Viabilidade de células HepG2 expostas a diferentes concentrações de PLA₂.

Tratamentos	Viabilidade%(média±DP)
NC	100±0,083
PC	8,8±0,002*
10 µg/mL	94,4±0,055
1 µg/mL	98,9±0,046
100 ng/mL	93±0,072
10 ng/mL	98,5±0,042
1 ng/mL	97,7±0,139
0,1ng/mL	98,9±0,067

CN=controle negativo control; CP=controle positivo, DP= desvio padrão. Valores seguidos de * são estatisticamente significativos com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

Figura 1. Viabilidade de células HepG2 expostas à diferentes concentrações de PLA₂.



CN=controle negativo; CP=controle positivo; 10 µg/mL, 1 µg/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL e 0,1 ng/mL=concentrações testadas de fosfolipase A₂ (PLA₂).

Pelos resultados obtidos, observou-se que nenhuma das concentrações de PLA₂ foi estatisticamente significativa, em relação ao controle negativo. Desta forma, as concentrações testadas não foram consideradas citotóxicas, por apresentarem viabilidades superiores a 80% (Tabela 1, Figura 1).

Segundo Santos et al. [15], o veneno da vespa *P. paulista* apresenta dois diferentes tipos de fosfolipase, a PLA₁ e a PLA₂, embora não seja conhecida a concentração de nenhuma delas neste veneno. Porém, Chen e Lariviere [16] descreveram que a quantidade de PLA₂ presente no veneno de *A. mellifera* é de aproximadamente 10 a 12% do peso seco do veneno. Deste modo, como nenhuma concentração de PLA₂, testada neste trabalho, foi citotóxica para HepG2 e como os dados previamente obtidos para as concentrações acima de 0,1µg/mL, para o veneno de *A. mellifera* foram citotóxicas para as células HepG2, esta concentração foi selecionada para os testes de MN realizados com o veneno da vespa (VV) e da abelha (VA). Já para os testes a serem realizados com a PLA₂, foi selecionada a concentração 10 ng/mL, correspondente a 10% do peso seco desta enzima nos venenos. Além da avaliação dos efeitos dos venenos e da PLA sobre as células HepG2, foi também possível avaliar se a fosfolipase é a substância responsável pelos efeitos danosos dos venenos sobre células HepG2.

3.2. Ensaio do cometa

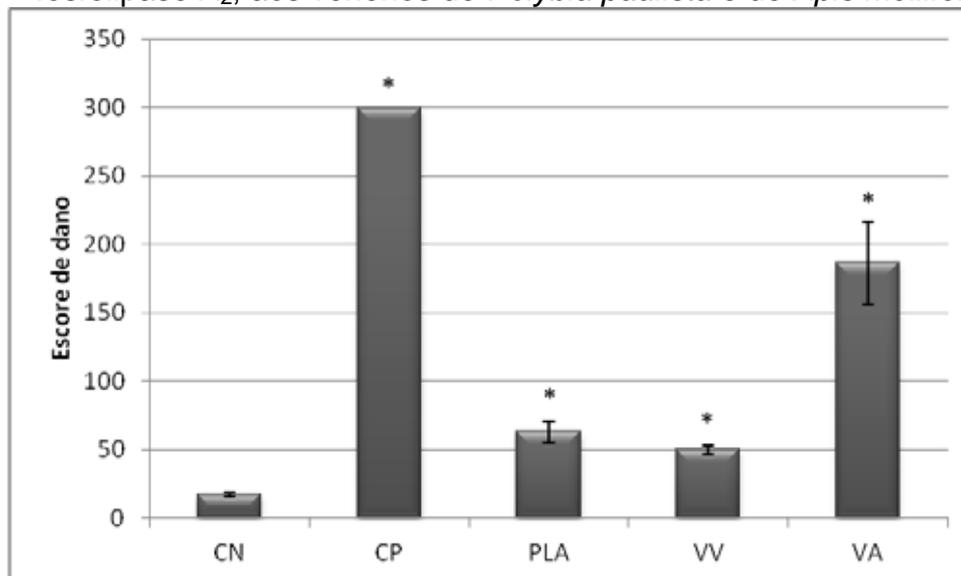
Os resultados para o ensaio do cometa realizados com as células HepG2 expostas por 3 horas à PLA₂, ao veneno de vespa e de abelha estão listados na Tabela 2, Figura 2.

Tabela 2. Genotoxicidade de diferentes concentrações de veneno de vespa, de abelha e da enzima PLA₂, para células HepG2, avaliada pelo ensaio do cometa.

Tratamentos	Número de células em cada classe do cometa				Escore de dano (Média±DP)	Viabilidade celular (%)
	Categorias de migração (Média±DP)					
	0	1	2	3		
NC	93±1	0,66±0,57	2,33±0,57	4±0	17,3±1,52	95
PC	0±0	0±0	0±0	100±0	300±0	98
PLA ₂ (10ng/mL)	68,66±4,32	12,83±5,27	6,33±1,63	12,18±2,31	62±7,66*	91,33
VV (0,1 µg/mL)	74,83±1,52	8,7±0,57	6,67±2,5	9,8±1	51,44±3,46*	96,03
VA (0,1 µg/mL)	3,16±2,63	46,16±16,53	16,83±7,41	33,83±19	186,33±30,33***	95

DP=desvio padrão; CN=controle negativo; CP=controle positivo; PLA=fosfolipase A₂; VV=veneno de vespa; VA=veneno de abelha(bee venom). Escore de dano: 0 = sem dano; 300 = dano máximo; * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo, ** = estatisticamente significativo com relação ao PLA₂ (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

Figura 2. Escore de danos observados em células HepG2 expostas, por 3 horas, à fosfolipase A₂, aos venenos de *Polybia paulista* e de *Apis mellifera*.



CN=controle negativo; CP=controle positivo; PLA=fosfolipase A₂; VV=veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

O maior escore de dano observado nos tratamentos foi o do veneno de abelha, seguido de PLA₂ e do veneno de vespa, todos eles estatisticamente significativos com relação ao controle negativo. Somente o veneno de abelha foi estatisticamente significativo com relação à fosfolipase A₂.

3.3. Teste do MN com bloqueio da citocinese (CBMN)

Os resultados para o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese para as células HepG2 expostas por 3 horas à PLA₂, ao veneno de vespa e de abelha estão listados na Tabela 3, Figura 3, 4 e 5.

Tabela 3. Mutagenicidade de diferentes concentrações de veneno de vespa, de abelha e da enzima PLA₂, para células HepG2, avaliada pelo ensaio do MN com bloqueio da citocinese.

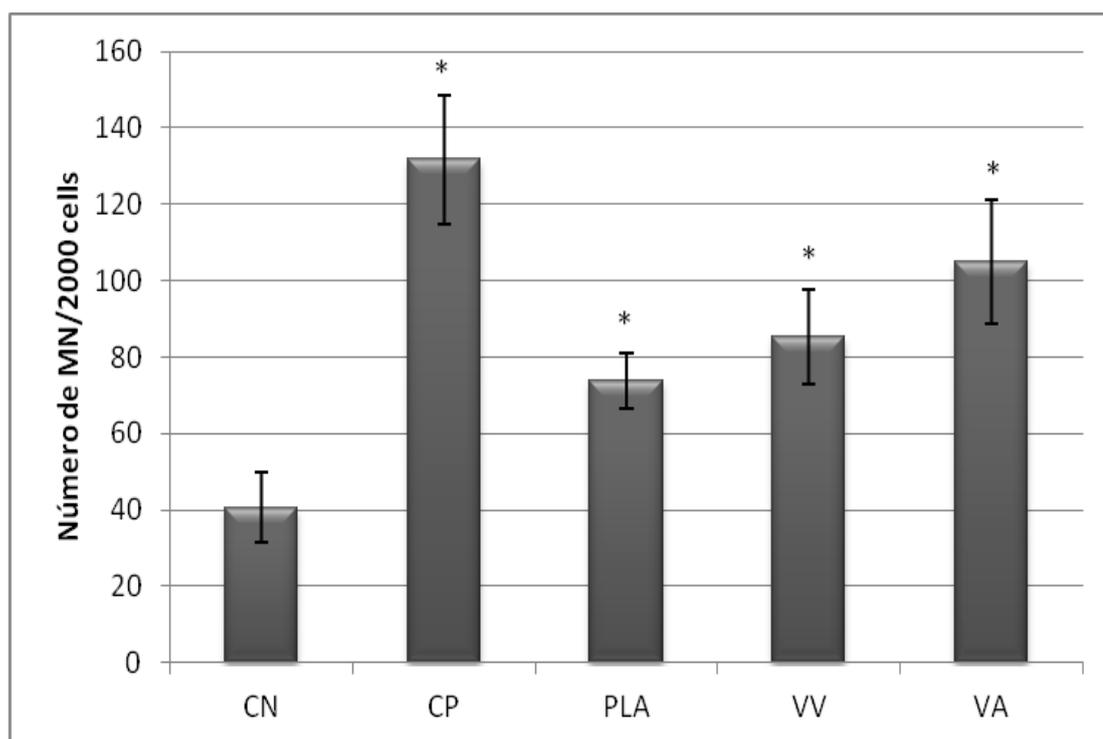
Tratamentos	MN (Média±DP)	Broto (Média±DP)	Ponte (Média±DP)
CN	40,66±9,01	30,66±10,96	8,66±0,57
CP	131,66±17,03*	99,66±8,02*	38,33±8,5*
PLA ₂ (10ng/mL)	73,66±7,238*	34,66±10,4	11,66±6,42
VV (0,1 µg/mL)	85,33±12,22*	30,66±9,23	7,33±3,05
VA (0,1 µg/mL)	105±16,09*	33,33±8,08	11,33±4,16

DP=desvio padrão; CN=controle negativo; CP=controle positivo; PLA=fosfolipase A₂; VV=veneno de vespa; VA=veneno de abelha. MN=micronúcleo, *=estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

Pelos nossos resultados, observa-se que o número de micronúcleos (MN) foi estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (CN) para todos os tratamentos (PLA₂, VV e VA). Apesar dos tratamentos com os venenos não serem estatisticamente significativos com relação à PLA₂, observa-se que o número de MN induzidos pelo VV e VA são mais altos que PLA₂, sendo ainda o número de MN de VA mais altos que os de VV.

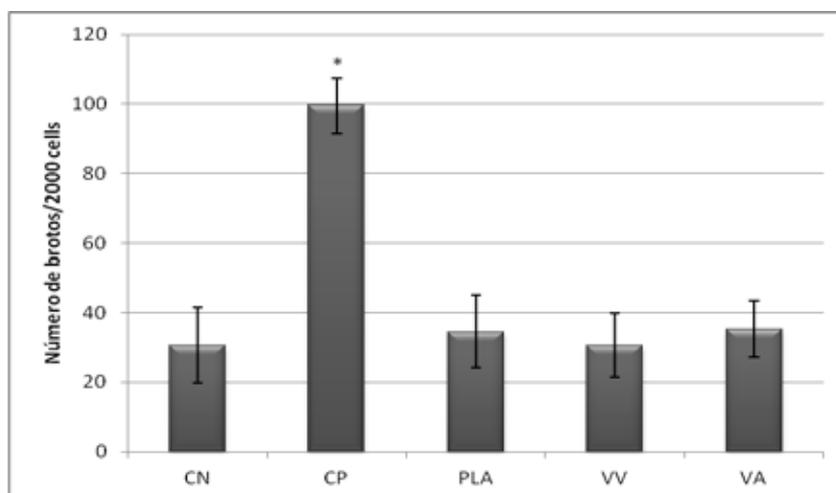
Os números de brotos e pontes nucleoplásmicas não foram estatisticamente significativos com relação ao controle negativo para nenhum dos tratamentos realizados (PLA₂, VV e VA) (Tabela 3, Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3. Número de micronúcleos/2000 células, após exposição aos diferentes tratamentos (VA, VV e PLA₂).



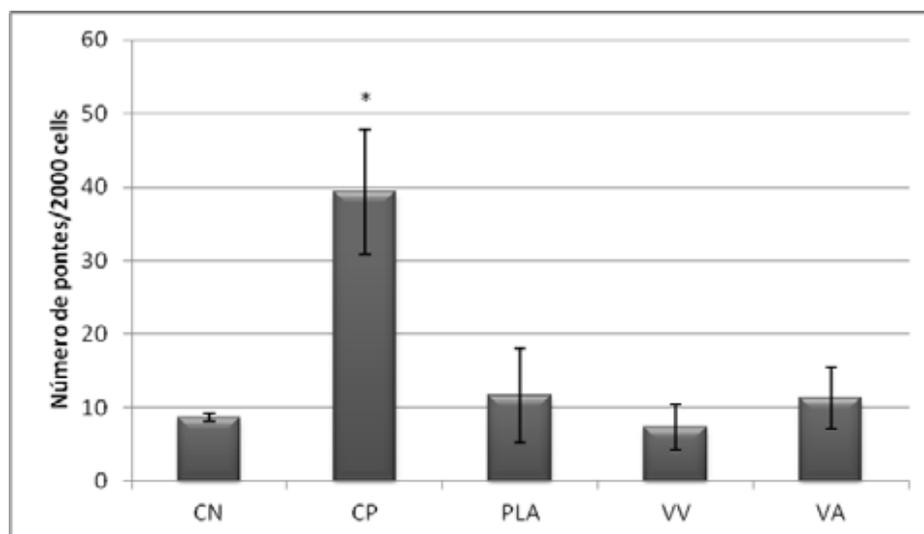
CN=controle negativo; CP=controle positivo; PLA=fosfolipase A₂; VV=veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

Figura 4. Número de brotos/2000 células após exposição aos diferentes tratamentos (VA, VV e PLA2).



CN=controle negativo; CP=controle positivo; PLA=fosfolipase A₂; VV=veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

Figura 5. Número de pontes/2000 células após exposição aos diferentes tratamentos (VA, VV e PLA2).



CN=controle negativo; CP=controle positivo; PLA=fosfolipase A₂; VV=veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

4. Discussão

Pelos resultados, observa-se que a PLA₂ apresenta um potencial indutor de danos ao material genético, como observado para o ensaio do cometa, que pode induzir mutações, como observado pelo teste do micronúcleo. A fosfolipase A₂ pode hidrolisar e digerir os componentes da membrana celular e, conseqüentemente, desestruturar a integridade da bicamada lipídica [17]. Segundo Arni e Ward [18], a fosfolipase A₂ hidrolisa especificamente a ligação éster *sn*-2 dos fosfolipídeos, sendo esta atividade aumentada em lipídeos lamelares e agregados micelares, tanto de membranas como de outras interfaces lipídeo-água.

As PLAs são enzimas abundantes na natureza e podem ser classificadas como “intracelulares” ou “extracelulares”. As PLA₂ intracelulares ocorrem associadas à membrana e estão relacionadas com o metabolismo de fosfolipídeos, transdução de sinais e outras funções celulares, enquanto que as PLA₂ extracelulares, abundantes em suco pancreático de mamíferos, em venenos de cobras e de insetos, possuem diferentes atividades, como a atividade catalítica que pode levar à liberação de ácido aracdônico [18].

O ácido aracdônico, na sua forma livre, está geralmente presente em baixos níveis nas células, sendo encontrado na posição *sn*-2 da membrana fosfolipídica. Este ácido pode ser liberado por meio de deacilação promovida por lipases, como a PLA₂ [19], aumentando assim a sua concentração celular. Assim, a fosfolipase A₂ que, segundo Hartman et al. [20] e Landucci et al. [21], possui efeito noniceptivo e inflamatório, é também importante na produção do ácido aracdônico, que é uma substância precursora dos eicosanóides [19], que serão posteriormente metabolizados em prostaglandinas por ciclooxigenases e em leucotrienos por lipooxigenases [16]. Os leucotrienos são mediadores inflamatórios [22] e este processo inflamatório pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Outra fonte de ERO seria a própria cascata de ácido aracdônico [23], que, de acordo com Adibhatla et al. [24], seu metabolismo oxidativo é uma importante fonte de ERO. As ERO promovem danos ao DNA e às proteínas [25], pois segundo Emerit [26], podem ter ação clastogênica, gerando efeitos genotóxicos. Assim, os efeitos genotóxico e mutagênico observados neste trabalho podem ser explicados pela ação da PLA₂ nas membranas biológicas, que levou a uma peroxidação lipídica, geradora de ERO, que pode ter atuado na molécula de DNA danificando-a.

A peroxidação lipídica promovida pela PLA₂ pode romper a membrana celular, promovendo uma alteração na sua estrutura e função, como alteração na fosforilação oxidativa, perda da atividade do citocromo P450 e perda da atividade de enzimas envolvidas com o transporte iônico. A alteração no transporte iônico pode levar a um aumento na permeabilidade da membrana, promovendo um desequilíbrio celular. A extensa atividade da PLA₂ pode levar à lise da membrana e, conseqüentemente à morte celular [27].

Os danos observados pelo ensaio do cometa, para VV, foi semelhante ao observado para o PLA₂. Deste modo, os danos induzidos por VV podem ter sido ocasionados pela ação do PLA₂. No entanto, o valor observado para VA foi muito mais alto que o observado para PLA₂, indicando que esta enzima não deve ser a única responsável pelos danos induzidos pelo VA.

O VA, segundo Chen e Lariviere [16], contém diversas substâncias, dentre elas a melitina, que constitui de 40 a 60% do peso seco do veneno. A melitina é uma proteína que hidrolisa membranas celulares, altera a permeabilidade celular e causa liberação de histaminas [28]. Esta substância atua como um detergente, por isso desestrutura as membranas celulares e libera aminas biogênicas e potássio. Além disso, também é conhecida por ativar a fosfolipase A2 [3]. Deste modo, o elevado dano causado no material genético das células HepG2 expostas ao veneno de abelha parecem estar relacionados com a atividade da melitina em associação com a PLA₂.

Para o teste do micronúcleo, observamos que, embora o número de micronúcleos tenha sido maior nas células expostas ao VA, seguidas de VV e PLA₂, os resultados mostram que a PLA₂ parece ser um dos indutores da formação de micronúcleo, uma vez que os dados de VA e VV não foram estatisticamente significativos, quando comparados com os resultados de PLA₂. Assim como já exposto, a PLA₂ funcionaria como um indutor indireto de formação de micronúcleos, uma vez que ela é capaz de causar formação de ERO e estas, conseqüentemente, induziriam o estresse oxidativo e a formação de micronúcleos nas células expostas, uma vez que EROs podem desestabilizar a estrutura do DNA e induzir mutações.

Segundo Kohen e Nyska [29], embora o DNA seja uma molécula estável e bem protegida, as ERO podem interagir com o DNA e causar diversos tipos de danos, como modificação das bases do DNA, quebras das fitas duplas e simples,

perda de purinas (promoção de sítios apurínicos), danos na desoxirribose, ligação cruzada DNA-proteína e danos no mecanismo de reparo do DNA.

Pelos nossos resultados, a fosfolipase parece não ser o único composto capaz de induzir a formação de micronúcleos. Como a fosfolipase é capaz de interferir na estrutura de membranas biológicas, este efeito faz com que as células fiquem mais permeáveis à entrada de outras substâncias presentes tanto no VV como VA e, assim, mais vulneráveis a ação das mesmas.

Venenos de Hymenoptera vêm sendo explorados em estudos de carcinogênese devido a sua ação citolítica [30-32]. Contudo, pelos nossos resultados, sugerimos que eventuais uso de venenos de vespas e abelhas com fins terapêuticos devam ser feito de forma criteriosa, uma vez que foi observado neste estudo, que a fosfolipase A₂ presente nos venenos de Hymenoptera, é capaz de induzir danos no material genético de células expostas, sendo as responsáveis pela genotoxicidade e mutagenicidade observada para os venenos de *A. mellifera* e *P. paulista*, provavelmente devido a formação de espécies reativas de oxigênio. Destacamos ainda que, mesmo as concentrações dos venenos de Hymenoptera que não apresentam potencial citotóxico, induziram danos no material genético devido à ação da PLA₂.

5. Agradecimentos

As autoras gostariam de agradecer a CAPES, ao Convênio-REPLAN: 1100.0067969.11.4 pelo apoio financeiro e ao Prof. Dr. Osmar Malaspina por ter cedido o veneno de abelha usado nos experimentos.

6. References

- [1] S. Zalut, J. Schmidt, T.I. Moawad. Lipase and phospholipase activities of Hymenoptera venoms (wasps and ants). *Egyptian Journal of Biology* 5 (2003) 138-147.
- [2] B. Przybilla, F. Ruëff. Hymenoptera venom allergy. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 8 (2010) 114–129.
- [3] Y.J. Lee, S.J. Kang, B.M. Kim, H.D. Woo, H.W. Chung. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions* 169(2007) 189-197.

- [4] V. Garaj-Vrhovac, G. Gajski, Evaluation of the cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to a high concentration of bee venom *in vitro*. *Arh Hig Rada Toksikol* 60 (2009) 27-34.
- [5] T. Abe, M. Sugita, T. Fujikura, J. Hiyoshi, M. Akasu. Giant hornet (*Vespa mandarina*) venomous phospholipases. The purification, characterization and inhibitory properties by bisclouaine alkaloids. *Toxicon* 38 (2000) 1803-1816.
- [6] E.M. Dotimas, K.R. Hamid, R.C. Hider, U. Ragnarsson. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. *Biochim Biophys Acta* 911 (1987) 285-293.
- [7] M.R. Oliveira, M.S. Palma. Polybiotoxins: a group of phospholipases A₂ from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). *Toxicon* 36 (1998) 189-199.
- [8] T. Mosmann. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*. 65 (1983) 55-63.
- [9] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [10] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- [11] D.M.F. Salvadori, L.R. Ribeiro, M. Fenech. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. IN: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds.). *Mutagênese Ambiental*, Canoas: Ed. ULBRA (2003) 201-223.
- [12] J. Rigonato, M.S. Mantovani, B.Q. Jordão. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for detection of genotoxicity. *Genet. Mol. Biol.* 28 (2005) 464-468.
- [13] A.T. Natarajan, F. Darroudi. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis* 6 (1991) 399-403.
- [14] M. Fenech, M.F. Crott. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504 (2002) 131-136.

- [15] L.D. Santos, K.S. Santos, J.R.A Pinto, N.B. Dias, B.M. Souza, M.F. Santos, J. Perales, G.B. Domont, F.M. Castro, J.E. Kalil, M.S. Palma. Profiling the Proteome of the Venom from the Social Wasp *Polybia paulista*: A Clue to Understand the Envenoming Mechanism. *J. Proteome Res.* 9 (2010) 3867-3877.
- [16] J. Chen, W.R. Lariviere. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A doyble-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92 (2010) 151-183.
- [17] N. Oršolić. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 31 (2012) 173-194.
- [18] R.K. Arni, R.J. Ward. Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon* 34 (1996) 827-841.
- [19] J. Balsinde, M.A. Balboa, P.A. Insel, E.A. Dennis. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 175-189.
- [20] D.A. Hartman, L.A. Tomchek, J.R. Lugay, A.C. Lewin, T.T. Chau, R.P. Carlson. Comparison of anti-inflammatory and antiallergic drugs in melittin- and D49 PLA₂-induced mouse paw edema models. *Agents Actions* 34 (1991) 84-88.
- [21] E.C. Landucci, M. Toyama, S. Marangoni, B. Oliveira, G. Cirino, E. Antunes, G. de Nucci. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 38 (2000) 199-288.
- [22] L. Paula, W.F. Santos, A. Malheiro, D. Carlos, L.H. Faccioli. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a model of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 6 (2006) 182-189.
- [23] S. Leutner, A. Eckert, W.E. Müller. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J. Neural Transm.* 108 (2001) 955-967.
- [24] R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, R.J. Dempsey. Phospholipase A₂, Hydroxyl Radicals, and Lipid Peroxidation in Transient Cerebral Ischemia. *Antioxid. Redox Signaling* 5 (2003), 647- 654.
- [25] H.U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5 (2000) 415-418.
- [26] I. Emerit. Reactive Oxygen Species, Chromosome Mutation, and Cancer: Possible Role of Clasogenic Factors in Carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.* 16 (1994) 99-109.

- [27] M.G. Salgo, F.P. Corongiu, A. Sevanian. Enhanced Interfacial Catalysis and Hydrolytic Specificity of Phospholipase A₂ toward Peroxidized Phosphatidylcholine Vesicles. *Arch. Biochem. Biophys.* 304 (1993) 123-132.
- [28] K.T. Fitzgerald, A.A. Flood. Hymenoptera Stings. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 21 (2006) 194-204.
- [29] R. Kohen, A. Nyska. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* 30 (2002), 620-650.
- [30] K.R. Wang, B.Z. Zhang, W. Zhang, J.X. Yan, J. Li, R. Wang. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide Polybia-MPI. *Peptides* 29 (2008) 963-968.
- [31] K.R. Wang, J.X. Yan, B.Z. Zhang, J.J. Song, P.F. Jia, R. Wang. Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer Letters* 278 (2009) 65-72.
- [32] J.E. Huh, Y.H. Baek, M.H. Lee, D.Y. Choi, D.S. Park, J.D. Lee. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumour-bearing-mice. *Cancer Letters* 292 (2010) 98-110.

**Indução de estresse oxidativo pelos venenos de vespa *Polybia paulista*,
de abelha *Apis mellifera* e pela fosfolipase A₂**

Márcia Miyuki Hoshina¹, Bruna de Campos Ventura-Camargo¹, Acácio Antonio Pigoso², Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

¹UNESP, Avenida 24 A, 1515, CP 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS, Avenida Dr. Maximiliano Barutto, 500, Jd. Universitário, CEP 13607-339 Araras, São Paulo, Brasil

*autor correspondente: +55 19 35264143; fax: +55 19 35360009

e-mail: mamm@rc.unesp.br

Artigo a ser submetido para a revista Toxicology In vitro

Resumo

Durante o metabolismo dos seres vivos há, naturalmente, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Para enfrentar os efeitos danosos causados por estas ROS, os organismos possuem sistema antioxidante, como as enzimas SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e GST (glutathione S-transferase). Quando a produção de ROS é excessiva, superando a capacidade celular de decompor as mesmas, a célula entra em estresse oxidativo. O estresse oxidativo gera inúmeros problemas tanto para as células como para todo o organismo, como, por exemplo, as mutações e os danos no DNA. Os venenos de Hymenoptera, assim como a PLA₂ (fosfolipase A₂), um dos principais constituintes do veneno destes organismos, em baixas concentrações podem induzir mutações e danos no material genético de células expostas. Sabendo-se que a PLA₂ é capaz de desestruturar membranas biológicas, o objetivo deste trabalho foi verificar se a PLA₂, bem com os venenos de vespa (*Polybia paulista*) e abelha (*Apis mellifera*), podem induzir peroxidação lipídica e alteração na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST) em células HepG2 expostas a estas substâncias e, assim, induzir estresse oxidativo. Neste trabalho foi verificado que todas as substâncias induziram peroxidação lipídica, sendo que os venenos de vespa e de abelha induziram maiores índices de peroxidação lipídica. A atividade da SOD foi diminuída em todos os tratamentos e a atividade das enzimas CAT e GST aumentada, sugerindo que todas as substâncias testadas são capazes de induzir alterações no padrão de atividade das enzimas e, conseqüentemente, induzir estresse oxidativo, que pode ocasionar danos no material genético das células, induzindo a mutações.

Palavras-chave: célula HepG2, SOD, CAT, GST, peroxidação lipídica

1. Introdução

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas durante o metabolismo normal das células (Matés, 2000). Desta maneira, as células ficam expostas a radicais livres tanto gerados pelo seu próprio metabolismo, como também aqueles advindos de atividades exógenas às células (Ramos et al., 2008). Quando quantidades excessivas de ROS são produzidas, pode haver um distúrbio no balanço pro-oxidante/anti-oxidante, em favor do estado pró-oxidativo (Valko et al., 2006). Quando ocorre este desequilíbrio nas funções celulares, devido à alta quantidade de ROS, o estresse oxidativo gerado pode induzir efeitos danosos no organismo, como por exemplo oxidação de lipídeos de membranas biológicas (peroxidação lipídica), oxidação de proteínas e danos no DNA (Antunes Neto et al., 2008).

Os fosfolipídeos da membrana de eucariotos estão constantemente expostos à oxidação. Quando as membranas dos organismos aeróbicos são peroxidadas, os produtos da peroxidação lipídica comprometem a viabilidade das células expostas (Valavanidis et al., 2006), por formar adutos de DNA, que podem gerar mutações e alterações no padrões da expressão gênica dos organismos (Marnett, 1999).

Para inativar e/ou bloquear os efeitos deletérios das ROS, o organismo possui duas classes de antioxidantes: um sistema não enzimático constituído por β -carotenos (pró vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e alfa tocoferol (vitamina E); e um sistema enzimático constituído pelas enzimas catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) (Powers et al., 1994).

Os venenos de himenópteros são misturas complexas compostas por substâncias biologicamente ativas. Dentre os venenos de himenópteros, podemos destacar os venenos de vespas e abelhas. Veneno de vespídeos é caracterizado por ser uma mistura altamente tóxica, composta por toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos, sendo que os componentes mais alérgenos são a fosfolipase A, a hialuronidase, o antígeno 5 e as proteases séricas (Han et al., 2008). Já o veneno da abelha *Apis mellifera* é composto por uma mistura de substâncias, onde os compostos mais representativos do veneno são a melitina, a fosfolipase A₂, apamina e os peptídeos degranuladores de mastócito (Lee et al., 2007).

De acordo com Chen e Lariviere (2010), a fosfolipase A₂ (PLA₂) representa aproximadamente 10 a 12% do peso seco do veneno de abelha *A. mellifera*, mas

esta quantidade não é especificada para os venenos de vespídeos. A melitina compreende de 40-50% do peso seco do veneno de abelha. A melitina é um peptídeo hemolítico, que promove o rompimento da atividade normal da célula e lise celular.

Estudos preliminares realizados por Hoshina et al (dados ainda não publicados) mostraram que os venenos da abelha *A. mellifera* e da vespa *P. paulista* induziram alterações no material genético de células HepG2. Pela alta concentração de fosfolipase A₂ nestes venenos, o objetivo do presente estudo foi verificar, por meio de ensaios de peroxidação lipídica, da atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT) e da glutathione S-transferase (GST), se é a PLA₂ presente nos venenos da vespa e da abelha é a substância responsável pela indução do estresse oxidativo observado.

2. Material e métodos

2.1. Material

2.1.1. Cultura de células humanas

Todos os ensaios de estresse oxidativo foram desenvolvidos com células HepG2, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC No HB 8065, Rockville, MD).

2.1.2. Substâncias químicas utilizadas

A fosfolipase A₂ utilizada neste experimento (CAS No. 9001-84-7, Sigma) é derivada de veneno de abelha.

2.1.3 Venenos

O veneno liofilizado da abelha *A. mellifera* foi gentilmente obtido junto ao Centro de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro.

Os espécimes da vespa *P. paulista*, utilizadas nesta pesquisa, foram gentilmente cedidas pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro. Para a obtenção do veneno destes organismos, os insetos capturados no campo e devidamente identificados pelos especialistas do CEIS foram, imediatamente, congelados a -80° C, para serem posteriormente dissecados. O veneno foi extraído,

com auxílio de pinças, 1160 glândulas de venenos. Os glândulas de veneno foram cuidadosamente lavados, perfurados e agitados suavemente em solução contendo Inibidor de Protease 1 mM (PMSF- Floureto de Sulfonil Metil Fenil) e centrifugados a 8000 rpm, por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi usado como extrato bruto do veneno, sendo posteriormente liofilizado em liofilizador “Centrivap Concentrator” (Labconco), acoplado a um condensador de solvente “Centrivap Ultra Low Cold Trap” (Labconco).

2.2. Métodos

2.2.1. Cultura de células HepG2

As células HepG2 foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm² em 5 mL de meio MEM (Meio Essencial Mínimo – Cultilab), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de CO₂ (5%), até atingirem confluência. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem celular é de aproximadamente 24 horas.

A quantidade de células, utilizadas para os testes de peroxidação lipídica, da catalase e da superóxido dismutase, foi de 3x10⁶ células e da glutathione S-transferase foi de 1x10⁶ células. Para todos os ensaios, as células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm², onde permaneceram por um período de 24 horas para estabilização.

As concentrações utilizadas nos experimentos se basearam, exclusivamente, nas informações de Chen e Lariviere, (2010), que relatam que a quantidade de PLA₂ presente no veneno de *A. mellifera* é de aproximadamente 10 a 12% do peso seco do veneno, uma vez que Santos et al. (2010) apenas citam que o veneno da vespa *P. paulista* apresenta tanto PLA₁ como PLA₂, sem quantificar a porcentagem destas substâncias para este veneno. Além disso, em estudo prévio conduzido pelos autores deste artigo, foi observado que concentrações de veneno de *A. mellifera* acima de 0,1 µg/mL são citotóxicas para HepG2, quando a células são expostas por 3 horas. Deste modo, foram escolhidas para a realização dos testes as concentrações de 0.1 µg/mL do veneno de vespa (VV) e de abelha (VA), bem como a concentração de 10 ng/mL PLA₂, que corresponde a 10% do peso seco dos venenos.

Após o período de estabilização de 24 horas, foram realizados ensaios em triplicata com células HepG2 expostas, por 3 horas, às concentrações de 0.1 µg/mL do veneno de vespa (VV) e de abelha (VA), e 10ng/mL PLA₂, conforme citado anteriormente. Posteriormente, os tratamentos foram retirados dos frascos e as células lavadas com PBS (2x). O excesso de material foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo posteriormente adicionado aos frascos de cultura 1 mL de PBS gelado. As células foram então despregadas da parede do frasco com o auxílio de um “scraper” e a suspensão celular foi transferida para tubo de centrifuga graduado. Esta suspensão foi sonicada em Sonicador (Fischer Scientific – Sonic Dismembrator Model 500), na frequência de 17% e tempo de 1 segundo para cada mL de suspensão celular.

2.2.2. 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. Foram misturados, em uma cubeta de quartzo, 1ml de suspensão celular com 3×10^6 células/mL com um meio contendo TBA 1% (preparado em NaOH 50 mM), 10 µL de NaOH 10 M e 500 µL de H₃PO₄ 20%. Essa mistura foi aquecida por 10 minutos em banho fervente. Passado este tempo, a mistura foi resfriada, sendo adicionado à cubeta 3 mL de n-butanol, para a extração do cromógeno. Em seguida, esta mistura foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, para separar a fase orgânica (com cromógeno), e submetida à leitura da absorbância em 532 nm. A concentração de substâncias reativas ao ácido TBARS foi calculada, baseando-se no valor de $\epsilon_{532} = 153000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.3. Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada a partir da sua capacidade de inibir a redução do composto nitrobluetetrazolium (NTB) a formazan, em pH alcalino. Para esta avaliação, foi utilizado o sistema xantina/xantina oxidase, que é capaz de gerar o ânion-radical superóxido, que por sua vez é capaz de reduzir o composto NTB (amarelo) em formazan (azul). O ensaio foi desenvolvido em cubeta de quartzo contendo uma solução de 3 mL de NTB 100 µM (Nitro Blue Tetrazolium Tablet – Sigma N5514-10TAB) diluído em tampão glicina 50 mM (pH 9,5), 100 uL de xantina 15 mM (Xanthine, minimum 99% - Sigma- X375 –

25g), dissolvido em DMSO e 200 μ L da suspensão celular (3×10^6 células/mL). A reação foi iniciada com adição de 20 μ L de 10 mU de xantina oxidase. A formação do cromógeno azul foi acompanhada em espectrofotômetro em 560 nm.

2.2.4. Avaliação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi medida segundo o método de Aebi (1984). Em uma cubeta de quartzo foram misturados 200 μ L da suspensão celular e 2 mL de PBS 0,1 M (pH 7,4, temperatura ambiente). A reação foi iniciada quando foi adicionado 50 μ L de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – 10 volumes) e a leitura foi feita durante 5 minutos. A velocidade da decomposição do H_2O_2 foi medida por espectrofotômetro, através da variação da absorbância em 240nm.

2.2.5. Avaliação da atividade da GST

A atividade da glutathione S-transferase foi medida de acordo com o kit Glutathione S-Transferase Assay Kit (Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, MI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A conjugação do 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida foi medida em espectrofotômetro a 340nm.

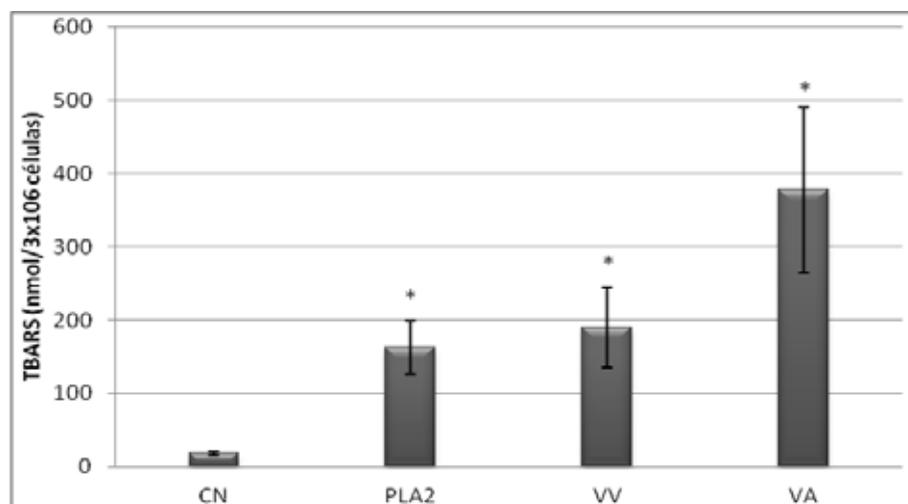
2.2.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas pela Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnet, com nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0

3. Resultados

Os resultados para os níveis de peroxidação lipídica, medida pelas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), estão apresentados na Figura 1.

Figura 1. Níveis de TBARS em células HepG2 expostas por 3 horas à PLA₂ e aos venenos de *P. paulista* e de *A. mellifera*.

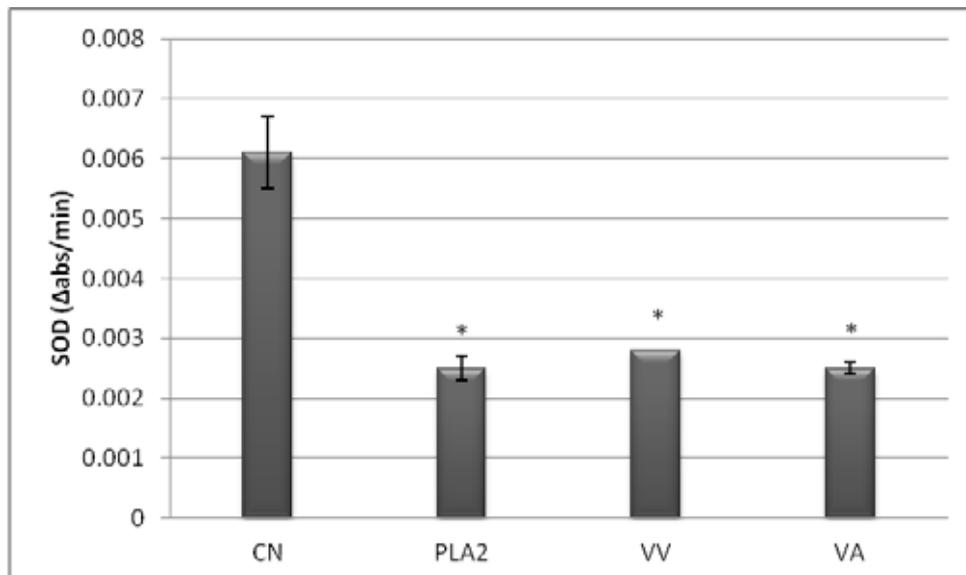


CN = controle negativo; PLA₂ = fosfolipase A₂; VV = veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0.05).

Pela análise dos resultados, podemos perceber que o controle negativo apresentou os menores níveis de TBARS, seguido da PLA₂, VV e VA, sendo que todos os tratamentos foram estatisticamente significativos com relação ao controle negativo. Os níveis de TBARS para células expostas ao VV foram mais altos do que os expostos ao PLA₂, enquanto que os valores de TBARS das células expostas ao VA foram muito mais elevados.

A atividade da SOD está representada na Figura 2. Pelos resultados, podemos observar que o controle negativo apresentou a maior atividade de SOD, sendo os resultados de PLA₂, VV e VA estatisticamente mais baixos que o controle.

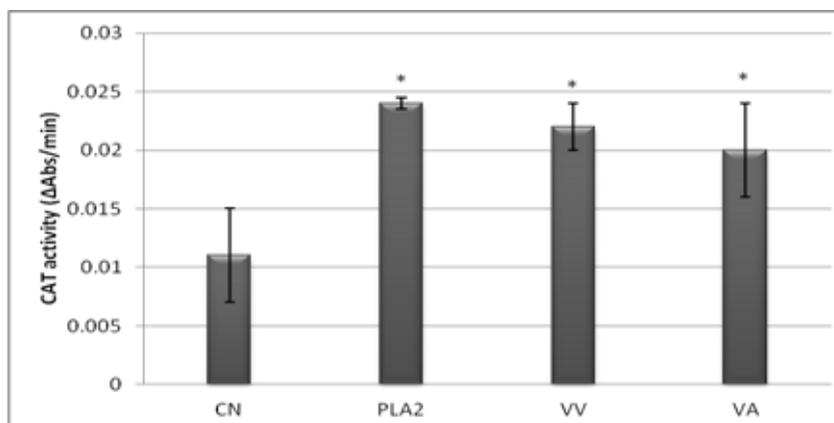
Figura 2. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em células HepG2 expostas por 3 horas à PLA₂ e aos venenos de *P. paulista* e *A. mellifera*.



CN = controle negativo; PLA₂ = fosfolipase A₂; VV = veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p < 0.05$).

Os dados referentes à atividade da catalase (CAT) são apresentados na Figura 3. Pelos dados, observa-se que todos os dados foram estatisticamente significativos, quando comparados ao controle negativo. As células expostas ao PLA₂ foram as que apresentaram os mais altos índices de CAT, seguido de VV e VA.

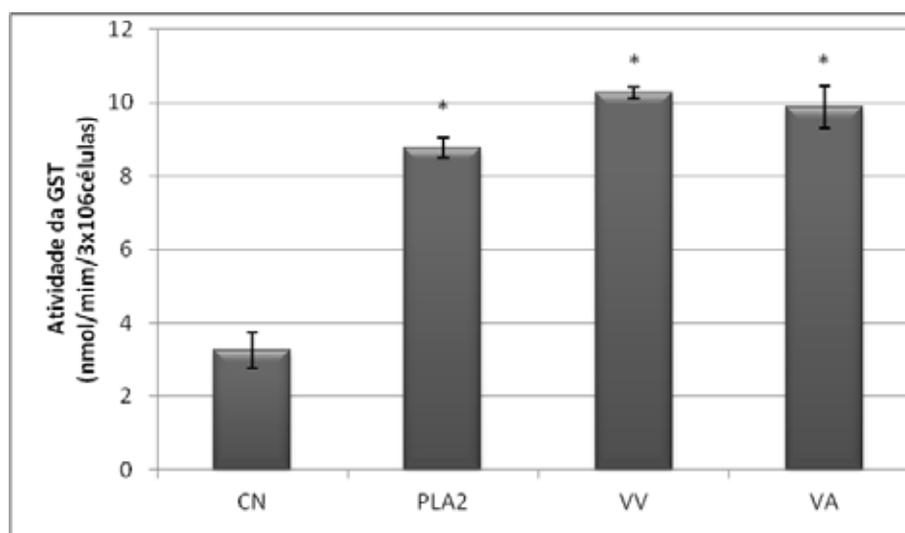
Figura 3. Atividade da catalase (CAT) em células HepG2 expostas por 3 horas à PLA₂ e aos venenos de *P. paulista* e de *A. mellifera*.



CN = controle negativo; PLA₂ = fosfolipase A₂; VV = veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, $p < 0.05$).

A Figura 4 apresenta os dados relativos à atividade da GST em células HepG2 expostas aos diferentes tratamentos. Observa-se que o controle negativo apresentou o menor valor e todos os outros tratamentos (PLA₂, VV e VA) foram estatisticamente mais elevados que o controle negativo.

Figura 4. Atividade da glutathiona S-transferase (GST) em células HepG2 expostas por 3 horas à PLA₂ e aos veneno de *P. paulista* e *A. mellifera*.



CN = controle negativo; PLA₂ = fosfolipase A₂; VV = veneno de vespa; VA=veneno de abelha. * = estatisticamente significativo com relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0.05).

4. Discussão

A peroxidação lipídica é uma das mais conhecidas manifestações de danos celulares oxidativos (Gutiérrez-Ruiz et al., 1999). Pelos resultados das nossas análises, pode-se observar que a fosfolipase A₂, assim como os VV e VA induzem a altas taxas de peroxidação lipídica, indicando que as substâncias testadas possuem capacidade de oxidar as membranas biológicas das células HepG2 expostas. As fosfolipases são responsáveis pela degradação dos lipídeos presente em membranas biológicas, acarretando em danos às células (Katsuki e Okuda, 1995).

O maior índice de peroxidação lipídica observada para células expostas aos venenos pode ser explicado pelo efeito sinérgico entre a PLA₂ presente nos venenos e outros compostos que fazem parte da composição dos venenos de *P. paulista* e de *A. mellifera*. Segundo Chen e Lariviere (2010), a fosfolipase A₂

(PLA₂) é capaz de produzir ácido aracdônico, que é posteriormente metabolizado em prostaglandinas pelas ciclooxigenases e em leucotrieno pelas lipooxigenases. Segundo Katsuki e Okuda (1995), o metabolismo oxidativo do ácido aracdônico é considerado como uma fonte significativa de ROS, fato este que pode ter ocasionado a peroxidação lipídica das células expostas aos tratamentos. Segundo estes mesmos autores, o metabolismo do ácido aracdônico pelas lipooxigenases pode gerar radicais superóxido, aumentando ainda mais a peroxidação lipídica, fazendo com que a enzima SOD seja recrutada para tentar degradar os radicais superóxido (O₂^{•-}) e o H₂O₂ (Hensley et al., 2000).

Segundo Adibhatla e Hatcher (2006), a degradação do ácido aracdônico contribui para a formação de peróxidos lipídicos, que são degradados a produtos aldeídicos reativos, como por exemplo, o malondialdeído, que se ligam covalentemente com proteínas e/ou ácidos nucleicos, alterando então a sua função e causando, posteriormente, danos celulares.

Quando as células ficam expostas a estresse oxidativo, normalmente os seus níveis de enzimas antioxidantes diminuem (Valavanidis et al., 2006). Nos nossos ensaios, foi observado que, quando as células foram expostas aos tratamentos, houve uma diminuição nos níveis da enzima SOD, que pode ser explicado pelo seu grande consumo para converter o radical superóxido (Mansour; Mossa, 2009) ou por um feedback negativo, uma superprodução de H₂O₂ (produto da atividade da SOD), que levaria a inibição da atividade da SOD. Este fato pode ser comprovado pelo aumento da atividade da catalase, observada nas células expostas aos tratamentos. Este aumento da atividade da catalase observada nas células HepG2 expostas aos diferentes tratamentos sugere uma resposta da célula para tentar impedir os danos causados pelo estresse oxidativo (Carvalho et al., 2012).

A catalase reduz a H₂O₂ (produzida pela atividade da SOD) em água ou, ainda, a H₂O₂ é decomposta pelas peroxidases dependentes da glutathione (Hensley et al., 2000). A glutathione S-transferase (GST) desempenha um papel importante na detoxificação de xenobióticos, drogas e carcinógenos e, deste modo, protege as células contra o stress oxidativo. Os níveis de expressão da GST são considerados um importante fator protetor do organismo contra efeitos adversos causados por toxicantes (Casalino et al., 2004), desse modo um aumento nos níveis de atividade da GST indicam uma tentativa da célula em se proteger dos efeitos danosos do estresse oxidativo.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode se concluir que a PLA₂ seria capaz de interferir na estrutura da membrana celular através da peroxidação lipídica. Neste processo haveria a degradação do ácido aracdônico, que levaria a geração de ROS, que então ativariam as enzimas com capacidade antioxidante. A elevação na atividade destas enzimas (CAT e GSH), juntamente com a diminuição da atividade da SOD, indicariam o estresse oxidativo gerado pela ação da PLA₂, responsável pela indução de danos genéticos observados nas células HepG2. O mesmo efeito foi também observado para os venenos de vespa (*P.paulista*) e abelha (*A.mellifera*), que pode ser atribuído à fosfolipase A₂, uma vez que ambos os venenos possuem este enzima em sua composição.

5. Agradecimentos

As autoras agradecem à CAPES e Convênio-REPLAN: 1100.0067969.11.4 pelo apoio financeiro, ao Prof. Dr. Osmar Malaspina do Centro de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro, que gentilmente cedeu o veneno de abelha usado neste trabalho.

6. References

- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2006. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radical Biol. Med.* 40, 376-387.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in Vitro*. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Antunes Neto, J.A., Rivera, R.J.B., Calvi, R.G., Raffa, M.F., Donadon, C.C., Pereira, A.G., Melo, P.S., 2008. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: *overreaching* induzido por treinamento de natação e câncer. *Ver. Bras. Med. Esporte* 14, 548-552.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.
- Carvalho, C.S., Bernusso, V.A., Araújo, H.S.S., Espíndola, E.L.G., Fernandes, M.N., 2012. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere* 89, 60-69.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C., 2004. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology* 200, 29-38.

- Chen, J., Lariviere, W.R., 2010. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92, 151-183.
- Gutiérrez-Ruiz, M.C., Quiroz, S.C., Souza, V., Bucio, L., Hernandez, E., Olivares, I.P., Llorente, L., Vargas-Vorackova, F., Kershenovich, D., 1999. Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde and LPS. *Toxicology* 134, 197-207.
- Han, J., You, D., Xu, X., Han, W., Lu, Y., Lai, R., Meng, Q., 2008. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*. 51, 914-922.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A., 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Bio. Med.* 28, 1456-1462.
- Katsuki, H., Okuda, S., 1995. Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog. Neurobiol.* 46, 607-636.
- Lee, Y.J., Kang, S.J., Kim, B.M., Woo, H.D., Chung, H.W., 2007. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions* 169, 189-197.
- Mansour, S.A., Mossa, A.T., 2009. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pestic Biochem. Physiol.* 93, 34-39.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83-95.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., Dudley, R., 1994. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266, 375-380.
- Ramos, A.A., Lima, C.F., Pereira, M.L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2008. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicol. Letters* 177, 66-73.
- Santos, L.D., Santos, K.S., Pinto, J.R.A., Dias, N.B., Souza, B.M., Santos, M.F., Perales, J., Domont, G.B., Castro, F.M., Kalil, J.E., Palma, M.S., 2010. Profiling the Proteome of the Venom from the Social Wasp *Polybia paulista*: A Clue to the Understand the Envenoming Mechanism. *Journal of Proteome Research*. 9, 3867-3877.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenaki, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.

6. Conclusão geral

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que:

- o sistema HepG2 foi um bom sistema-teste para avaliar os parâmetros analisados;
- o veneno da vespa *P. paulista* apresentou citotoxicidade em concentrações acima de 10 µg/mL. As concentrações entre 10 µg/mL e 0,01 µg/mL apresentaram potencial genotóxico e mutagênico, enquanto que as concentrações de 1 ng/ml, 100 pg/mL e 10 pg/mL não foram genotóxicas e nem mutagênicas. Assim, quando administradas com uma substância reconhecidamente genotóxica e mutagênica (MMS), elas não foram capazes de inibir e/ou inativar a ação do mutágeno, indicando que a substância não apresenta potencial antígenotóxico e nem antimutagênico;
- o veneno de abelha *A. melífera* apresentou citotoxicidade em concentrações acima de 0,1 µg/mL. As concentrações entre 0,1 µg/mL e 100 pg/mL apresentaram potencial genotóxico e mutagênico, enquanto que as concentrações de 10 pg/mL, 1 pg/mL e 0,1 pg/mL, não induziram genotoxicidade e nem mutagenicidade. Quando administradas com o MMS induziram genotoxicidade e mutagenicidade, indicando que esta substância também não é um agente antígenotóxico e nem antimutagênico;
- o veneno de abelha se mostrou muito mais potente, com relação à citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, em relação ao veneno de vespa. Este efeito pode ser devido à diferença na composição química dos dois venenos;
- os dois venenos possuem em sua composição a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), que é uma substância com capacidade de interagir com a estrutura de membranas biológicas. - a concentração de 10 ng/mL de PLA₂ (utilizada no ensaio do cometa e do micronúcleo) induziu genotoxicidade e mutagenicidade, indicando que esta substância pode ser uma das responsáveis pela genotoxicidade e mutagenicidade induzidas pelos venenos de Hymenoptera. No entanto, a PLA₂ parece ter um efeito aditivo com outros componentes dos venenos, que no caso de *A. melífera*, supõe-se que seja a melitina, uma vez que esta substância é o composto mais abundante do veneno destes insetos;
- nos ensaios realizados para se avaliar o potencial de indução de estresse oxidativo, observou-se que todas as substâncias testadas (PLA₂, veneno de *P. paulista* e *A. melífera*) induziram peroxidação lipídica, um importante indicador de estresse oxidativo. As atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathione S-

transferase (GST) aumentaram nas células expostas aos tratamentos enquanto que a atividade da superóxido dismutase (SOD) diminuiu. Estas alterações são indicativas de estresse oxidativo. A diminuição da SOD pode ser explicada pelo fato de que a maioria das enzimas foram utilizadas para degradar o radical superóxido derivado da peroxidação lipídica e, com isso, houve a geração de peróxido de hidrogênio (produto da degradação do radical superóxido pela SOD), o que levou a um aumento do nível da atividade da CAT. O aumento da atividade da GST indica uma reação de detoxificação celular, que leva a uma minimização dos efeitos do estresse oxidativo;

- a geração de ERO e do estresse oxidativo parecem ser os indutores dos danos genéticos observados nas células HepG2 expostas aos tratamentos;
- embora os venenos de abelha e vespa estejam sendo bastante estudados, devido ao seu potencial anticarcinogênico, deve-se ter muita cautela na administração ou indicação destes produtos em qualquer tipo de terapia, uma vez que concentrações não citotóxicas dos venenos podem induzir danos e mutações no DNA de células, como observado para as células HepG2. Essas substâncias também interferiram nas atividades de estabilização das membranas biológicas (preconizada como base para os tratamentos de cânceres), podendo ser danosas, por poderem interagir com moléculas orgânicas e afetar suas funções.

7. Referências Bibliográficas

ABE, T., SUGITA, M., FUJIKURA, T., HIYOSHI, J., AKASU, M. Giant hornet (*Vespa mandarina*) venomous phospholipases. The purification, characterization and inhibitory properties by bisclouaine alkaloids. **Toxicon**, v. 38, p.1803-1816, 2000.

ADIBHATLA, R.M., HATCHER, J.F. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. **Free Radical Biol. Med.**, v.40, p.376-387, 2006.

AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

ANTUNES NETO, J.A., RIVERA, R.J.B., CALVI, R.G., RAFFA, M.F., DONADON, C.C., PEREIRA, A.G., MELO, P.S. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: *overreaching* induzido por treinamento de natação e câncer. **Ver. Bras. Med. Esporte**, v.14, p.548-552, 2008.

AOKI, J., INOUE, A., MAKIDE, K., SAIKI, N., ARAI, H. Structure and function of extracellular phospholipase A₁ belonging to the pancreatic lipase gene family. **Biochimie**, v.89, p.197-204, 2007.

ARNI, R.K., WARD, R.J. Phospholipase A₂ - A structural review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.

ARORA, A.S., de GROEN, P., EMORI, Y., GORES. G.J.. A cascade of degradative hydrolase activity contributes to hepatocyte necrosis during anoxia. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p.G238–G245, 1996.

ARRIAGA-ALBA, M., BLASCO, J.J., RUÍZ-PÉREZ, N.J., SÁNCHEZ-NAVARRETE, J., RIVERA-SÁNCHEZ, R., GONZÁLEZ-AVILA, M.. Antimutagenicity mechanisms of the *Rhoeo discolor* ethanolic extract. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 63, p.243-248, 2011.

AZAD, N., ROJANASAKUL, Y., VALLYATHAN, V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. **J. Toxicol. Environ. Health, Part B**, v.11, p.1-15, 2008.

BALSINDE, J., BALBOA, M.A., INSEL, P.A., DENNIS, E.A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.39, p.175-189, 1999.

BILÓ, B.M., RUEFF, F., MOSBECH, H., BONIFAZI, F., OUDE-ELBERINK, J.N.G., EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. **Allergy**, v.60, p.1339-1349, 2005.

BIANCHI, J. ESPINDOLA, E.L.G., MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.74, p.826-833, 2011.

BRUSICK, D.J. Ed. **Principles of Genetic Toxicology**. Plenum Press, New York, p. 284, 1987.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v.52, p.302-310, 1978.

CABRERA, M.P., ALVARES, D.S., DE SOUZA, B.M., PALMA, M.S., RISKE, K.A., NETO, J.R. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: lytic activity and clustering observed with giant vesicles. **Langmuir**, v.27, p.10805-10813, 2011.

CALVETE, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of Proteomics**, v. 72, p.121-126, 2009.

CARIÑO-CORTÉS, R., HERNÁNDEZ-CERUELOS, A., TORRES-VALENCIA, J.M., GONZÁLEZ-AVILA, M., ARRIAGA-ALBA, M., MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. **Toxicol. In Vitro**, v.21, p.691-697, 2007.

CARVALHO, C.S., BERNUSSO, V.A., ARAÚJO, H.S.S., ESPÍNDOLA, E.L.G., FERNANDES, M.N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, p.60-69, 2012.

CASALINO, E., SBLANO, C., LANDRISCINA, V., CALZARETTI, G., LANDRISCINA, C. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. **Toxicology**, v. 200, p.29-38, 2004.

CEMELI, E., BAUMGARTNER, A., ANDERSON, D. Antioxidants and the Comet assay. **Mutat. Res.**, v.681, p.51-67.2009.

ČEŘOVSKÝ, V., SLANINOVÁ, J., FUČÍK, V., HULAČOVÁ, H., BOROVIČKOVÁ, L., JEŽEK, R., BEDNÁROVÁ, L. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. **Peptides**, v.29, p.992-1003, 2008.

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

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem. Biol. Interact.**, v.72, p.1-56, 1989.

CUNHA, A.O.S., MORTARI, M.R., OLIVEIRA, L., CAROLINO, R.O.G., COUTINHO-NETTO, J., SANTOS, W.F. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. **Comparative Biochemically and Physiology, Part C**, v.141, p.50-57, 2005.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibtiors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1988.

DOOSTDAR, H., GRANT, M.H., MELVIN, W.T., WOLF, C.R., BURKE, M.D. The effects of inducing agents on cytochrome P450 and UDP-glucuronyltransferase activities in human HepG2 hepatoma cells. **Biochem. Pharmacol.**, v.46, p.629-635, 1993.

DOTIMAS, E.M.; HIDER, R.C. Honeybee venom. **Bee World**, v. 68, p. 51-70, 1987.

DOTIMAS, E.M., HAMID, K.R., HIDER, R.C., RAGNARSSON, U. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. **Biochim Biophys Acta**, v.911, p.285-293, 1987.

DUKE, R.C., WITTER, R.Z., NASH, P.B., YOUNG, J.D., OJCIUS, D.M. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. **FASEB J.**, v.8, p.237-246, 1994.

EL-SAFORY, N.S., FAZARY, A.E., LEE, C.K. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p.165-181, 2010.

EMERIT, I. Reactive Oxygen Species, Chromosome Mutation, and Cancer: Possible Role of Clastogenic Factors in Carcinogenesis. **Free Radical Bio. Med.**, v.16, p.99-109, 1994.

FAVREAU, P., MENIN, L., MICHALET, S., PERRET, F., CHENEVAL, O., STÖCKLIN, M., BULET, P., STÖCKLIN, R. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. **Toxicon**, v.47, p.676-687, 2006.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v.455, p.81-95, 2000.

FENECH, M., CROTT, M.F. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v.504, p.131-136, 2002.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.**, v.600, p.58-66, 2006.

FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutat. Res.**, v.307, p.395-410, 1994.

FERGUSON, L.R., LAING, W.A. Chronic inflammation, mutation and human disease. **Mutat. Res.**, v.690, p.1-2, 2010.

FERRER, M., SÁNCHEZ-LAMAR, A., FUENTES, J.J., BARBÉ, J., LLAGOSTERA, M. Studies on the antimutagenesis of *Plyllanthys orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. **Mutat. Res.**, v.498, p.99-105, 2001.

FITZGERALD, K.T., FLOOD, A.A. Hymenoptera Stings. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.**, v.21, p.194-204, 2006.

FLOREA, A.M., BÜSSELBERG, D. Anti-cancer drugs interference with intracellular calcium signaling. **NeuroToxicology**, v.30, p.803-810, 2009.

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

GARAJ-VRHOVAC, V., GAJSKI, G. Evaluation of the cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to a high concentration of bee venom *in vitro*. **Arh Hig Rada Toksikol**, v.60, p.27-34, 2009.

GIACOMELLO, M., DRAGO, I., PIZZO, P., POZZAN, T. Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. **Cell Death Differ**, v.14, p.1267-1274, 2007.

GRIJALBA, M.T., VERCESI, A.E., SCHREIER, S. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, v.38, p.13279-13287, 1999.

GUTIÉRREZ-RUIZ, M.C., QUIROZ, S.C., SOUZA, V., BUCIO, L., HERNANDEZ, E., OLIVARES, I.P., LLORENTE, L., VARGAS-VORACKOVA, F., KERSHENOBICH, D. Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde and LPS. **Toxicology**, v.134, p.197-207, 1999.

GUSOVSKY, F., SOERGEL, D. G.; DALY, J. W. Effects of mastoparan and related peptides on phosphoinositide breakdown in HL-60 cells and cell-free preparations. **Eur. J. Pharmacol.**, v.206, p.309-314, 1991.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. **Science**, v. 177, p. 314-322, 1972.

HAN, J., YOU, D., XU, X., HAN, W., LU, Y., LAI, R., MENG, Q. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. **Toxicon**, v.51, p.914-922, 2008.

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. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v.64, p.e67-e72, 2011.

HARTMAN, D.A., TOMCHEK, L.A., LUGAY, J.R., LEWIN, A.C., CHAU, T.T., CARLSON, R.P. Comparison of anti-inflammatory and antiallergic drugs in melittin- and D49 PLA2-induced mouse paw edema models. **Agents Actions**, v.34, p.84-88, 1991.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutat. Res.**, v.399, n.2, p.125-133, 1998.

HENSLEY, K., ROBINSON, K.A., GABBITA, S.P., SALSMAN, S., FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Bio. Med.**, v.28, p.1456-1462, 2000.

HIDER, R.C. Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides. **Endeavour**, v. 12, p. 60-65, 1988.

HIRATA, Y., NAKAJATA, N., OHIZUMI, Y. Identification of a 97kDa mastoparan-binding protein involving in Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Mol. Pharmacol.**, v.57, p.1235-1242, 2000.

HIRATA, Y., ATSUMI, M., OHIZUMI, Y., NAKAHATA, N. Mastoparan binds to glycogen phosphorylase to regulate sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release in skeletal muscle. **Biochem. J.**, v.371, p.81-88, 2003.

HOFFMAN, D.R. Hymenoptera Venom Allergens. **Clin. Rev. Allerg. Immu.**, v.30, p.109-128, 2006.

HOLST, C.M., OREDSSON, S.T. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.379-387, 2005.

HOSHINA, M.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutat. Res.**, v. 656, p. 44-48, 2008.

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 mice in vivo. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, p. 83-89, 2006.

HUH, J.E., BAEK, Y.H., LEE, M.H., CHOI, D.Y., PARK, D.S., LEE, J.D. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumour-bearing-mice. **Cancer Letters**, v.292, p.98-110, 2010.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens: their modes of action. **Bio Essays**, v.7, 113–115, 1987.

KATSUKI, H., OKUDA, S. Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. **Prog. Neurobiol.**, v.46, p.607-636. 1995.

KIM, M.J.; PARK, S.D.; LEE, A.R.; KIM, K.H.; JANG, J.H.; KIM, K.S. The effect of bee venom acupuncture on protease activity and free radical damage in synovial fluid from collagen –induced arthritis in rats. **J. Kor. Acu. Mox. Soc.**, v. 19, p. 161-175, 2002.

KING, T.P., VALENTINE, M.D. Allergens of Hymenopteran venoms. **Clin Rev Allergy.**, v.5, p.137-148, 1987.

KNASMÜLLER, S., PARZEFALL, W., SANYAL, R., ECKER, S., SCHWAB, C., UHL, M., MERSCH-SUNDERMANN, V., WILLIAMSON, G., HIETSCH, G., LANGER, T., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat. Res.**, v.402, p.185-202, 1998.

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.

KOHEN, R., GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, p.149-157, 2000.

KOHEN, R., NYSKA, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v.30, p.620-650, 2002.

KOMISSAROVA, E.V., SAHA, S.K., ROSSMAN, T.G. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 202, p.99-107, 2005.

KONNO, K.; HISADA, M.; FONTANA, R.; LORENZI, C.C.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; MIWA, A.; KAWAI, N.; NAKATA, Y.; YASUHARA, T.; RUGGIERO NETO, J.; de AZEVEDO Jr., W.F.; PALMA, M.S.; NAKAJIMA, T. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1550, p. 70-80, 2001.

KORTESUO, P.T.; NEVALAINEN, T.J.; BUCHLER, M.; UHL, W. Characterization of two phospholipase A₂ in serum of patients of with sepsis and acute pancreatitis. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 30, p. 263-269, 1992.

KUCHLER, K., GMACHL, M., SIPPL, M.J., KREIL, G. Analysis of the cDNA for phospholipase A₂ from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. **Eur. J. Biochem.**, v.184, p.249-254, 1989.

KURODA, Y.; SHIMA, N.; YAZAWA, K.; KAJI, K. Desmutagenic and bio-antimutagenic activity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research**, v. 497, p. 123-130, 2001.

LANDUCCI, E.C., TOYAMA, M., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., CIRINO, G., ANTUNES, E., de Nucci, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicol**, v.38, p.199-288, 2000.

LEE, Y.J., KANG, S.J., KIM, B.M., 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.

LEME, D.M., GRUMMT, T., HEINZE, R., SEHR, A., RENZ, S., REINEL, S., OLIVEIRA, D.P., FERRAZ, E.R.A., MARCHI, M.R.R., MACHADO, M.C., ZOCCOLO, G.J. MARIN-MORALES, M.A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v.199-200, p.343-349, 2012.

LEUTNER, S., ECKERT, A., MÜLLER, W.E. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. **J. Neural Transm.**, v.108, p.955-967, 2001.

LEWIS, R.J., GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.2, p.790-802, 2003.

LI, M.L., LIAO, R.W., QIU, J.W., WANG, Z.J., WU, T.M. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v.13, p.203-208, 2000.

LIAO, W., McNUTT, M.A., ZHU, W.G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v.48, p. 46-53, 2009.

LIU, X.; CHEN, D.; XIE, L.; ZHANG, R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cell in vitro and growth of murine B16 melanomas in vivo. **Pharm. Pharmacol.**, v. 54, p. 1083-1089, 2002.

LOKESHWARI, R.K., SHANTIBALA, T. A. Review on the Fascinating World of Insect Resources: Reason for Thoughts. **Psyche**, v.2010, p.1-11, 2010.

LORENZI, C.C.B. **Estudo Estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias**. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

MANSOUR, S.A., MOSSA, A.T. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. **Pestic Biochem. Physiol.**, v.93, p.34-39, 2009.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat. Res.**, v.424, p.83-95, 1999.

MATÉS, J.M., PÉREZ-GÓMEZ, C., CASTRO, I.N. Antioxidante Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, v.32, p.595-603, 1999.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83-104, 2000.

MIKOLIĆ, B., MITIĆ-ĆULAFIĆ, D., VULAKOVIĆ-GAČIĆ, B., KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor,

eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. **Food Chem. Toxicol.**, v.49, p.2035-2045, 2011.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutat. Res.**, v.399, n.2, p.135-147, 1998.

MOON, D.O., PARK, S.Y., HEO, M.S., KIM, K.C., PARK, C., KO, W.S., CHOI, Y.H., KIM, G.Y. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemia U937 cells through downregulation of ERK and Akt. **Int. Immunopharmacol.**, v.6, p.1796-1807, 2006.

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

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods.**, v.65, p.55-63, 1983.

NAKAJIMA, T., YASUHARA, T., UZU, S., WAJAMATSU, K., MIYAZAWA, T., FUKUDA, K., TSUKAMOTO, Y. Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Peptides**, v.6, p.425-430, 1985.

NAKAJIMA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, K.; SAITO, K.; MIYAZAWA, T.; YASUHARA, T.; TSUKAMOTO, Y.; FOJINO, M. Amphiphilic peptides in wasp venoms. **Biopolymers**, v. 25, p. 115-121, 1986.

NATARAJAN, A.T., DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v.6, p.399-403, 1991.

NICOLAS, J.P.; LIN, Y.; JAMBEAU, G.; GOMASHCHI, F.; LAZDUNSKY, M.; GELB, M.H. Localization of structural elements of bee venom phospholipase A₂ involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 7173-7181, 1997.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A₂s and lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1488, p.167-181, 2000.

NOVICK, A.; SZILARD, L. Anti-mutagens. **Nature**, v. 170, p. 926-927, 1952.

OLIVEIRA, M.R.; PALMA, M.S. Polybitoxins: a group of phospholipases A₂ from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). **Toxicon**, v. 36, p. 189-199, 1998.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**, v.20, p. 1225-1233, 2006.

ORŠOLIĆ, N., ŠVER, L., VERSTOVŠEK, S., TERZIĆ, S., BAŠIĆ, I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo* by bee venom. **Toxicon**, v.41, p.861–870, 2003.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev.**, v.31, p.173-194, 2012.

PAULA, L.; SANTOS, W.F.; MALHEIRO, A.; CARLOS, D.; FACCIOLI, L.H. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a model of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p. 182-189, 2006.

PERIANIN, A., SNYDERMAN, R. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanism for elevating cytosolic calcium and inositol triphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v.143, p.1669-1673, 1989.

PFEIFFER, D.R., GUDZ, T.I., NOVGORODOV, S.A., ERDAHL, W.L. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.4923-4932, 1995.

POWERS, S.K., CRISWELL, D., LAWLER, J., JI, L.L., MARTIN, D., HERB, R.A., DUDLEY, R. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v.266, p. 375-380, 1994.

PRZYBILLA, B., RUËFF, F. Hymenoptera venom allergy. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.8, p.114–129, 2010.

PUTZ, T.; RAMONER, R.; GANDER, H.; RAHM, A.; BARTSCH, G.; THURNHER, M. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A₂ and phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphate. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 55, p. 1374-1383, 2006.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUEZ, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991. 59p.e 75p.

RAMOS, A.A., LIMA, C.F., PEREIRA, M.L., FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. **Toxicol. Letters**, v.177, p.66-73, 2008.

REISMAN, R.E., LIVINGSTON, A. Venom immunotherapy: 10 years of experience with administration of single venoms and 50 micrograms maintenance doses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.89, p.1189-1195, 1992.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003, 356p.

RIBEIRO, S.P., MENDES, M.A., SANTOS, L.D., SOUZA, B.M., MARQUES, M;R., AZEVEDO JR. W.F.A., PALMA, M.S. Structural and functional characterization of N-

terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v.25, p.2069-2078, 2004.

RIGONATO, J., MANTOVANI, M.S., JORDÃO, B.Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for detection of genotoxicity. **Genet. Mol. Biol.**, v.28, p.464-468, 2005.

ROCHA, T.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. **Toxicon**, v. 50, p. 589-599, 2007.

SALGO, M.G., CORONGIU, F.P., SEVANIAN, A. Enhanced Interfacial Catalysis and Hydrolytic Specificity of Phospholipase A₂ toward Peroxidized Phosphatidylcholine Vesicles. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.304, p.123-132, 1993.

SALVADORI, D.M.F., RIBEIRO, L.R., FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. IN: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds.). Mutagênese Ambiental, Canoas: Ed. ULBRA, p.201-223, 2003.

SANTOS, L.D. **Caracterização Molecular dos Antígenos Imunodominantes do veneno da vespa social *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae)**. Tese de Doutorado (Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

SANTOS, L.D., SANTOS, K.S., SOUZA, B.M., ARCURI, H.A., CUNHA-NETO, E., CASTRO, F.M., KALIL, J.E., PALMA, M.S. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A₁ from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**, v.50, p.923-937, 2007.

SANTOS, L.D., SANTOS, K.S., PINTO, J.R.A., DIAS, N.B., SOUZA, B.M., SANTOS, M.F., PERALES, J., DOMONT, G.B., CASTRO, F.M., KALIL, J.E., PALMA, M.S. Profiling the Proteome of the Venom from the Social Wasp *Polybia paulista*: A Clue to Understand the Envenoming Mechanism. **J. Proteome Res.**, v.9, p.3867-3877, 2010.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutat. Res.**, v.393, n.1-2, p.133-139, 1997.

SHIMIZU, N., ITOH, N., UTIYAMA, H., WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell Biol.** v.140, p.1307-1320, 1998.

SHIMIZU, N., SHIMUARA, T., TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res.**, v.448, p.81-90, 2000.

SIMON, H.U., HAJ-YEHIA, A., LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v.5, p.415-418, 2000.

SINGH, N.P., McCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, 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.

SOUZA, B.M., MENDES, M.A., SANTOS, L.D., MARQUES, M.R., CÉSAR, L.M.M, ALMEIDA, R.N.A., PAGNOCCA, F.C., KONNO, K., PALMA, M.S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v.26, p.2157-2164, 2005.

SOUZA, B.M., SILVA, A.V.R., RESENDE, V.M.F., ARCURI, H.A., CABRERA, M.P.S., NETO, J.R., PALMA, M.S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v.30, p.1387-1395, 2009.

SUH, S.J., KIM, K.S., KIM, M.J., CHANG, Y.C., LEE, S.D., KIM, M.S., KWON, D.Y., KIM, C.H. Effects of the bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats. **Toxicol. In Vitro**, v.20, p.1465-1471, 2006.

TERWILLIGERT, T.C., EISENBERG, D.. The Structure of Melittin. II. Interpretation of the structure. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.6016-6022, 1982.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.35, p.206-221, 2000.

TU, W.C., WU, C.C., HSIEH, H.L., CHEN, C.Y., HSU, S.L. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. **Toxicol.**, v.52, p.318-329, 2008.

UENOBE, F., NAKAMURA, S., MIYAZAWA, M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. **Mutat. Res.**, v.373, p.197-200, 1997.

VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKI, M., SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.64, p.178-189, 2006.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J-C.; LE BON, A-M.; CHAGNON, M-C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutat. Res.**, v.536, p.79-90, 2003.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v.160, p.1-40, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VARANDA, E.A., MONTI, R., TAVARES, D.C. Inhibitory effects of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct- and indirect-acting mutagens. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v.19, p.403-413, 1999.

WAHBY, A.F., MAHDY, E-S. M.E., EL-MEZAYEN, H.A., SALAMA, W.H., ABDEL-ATY, A.M., FAHMY, A.S. Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom hyaluronidase: Purification, partial characterization and evidence for its action as a spreading factor. **Toxicon**, v.60, p.1380-1389, 2012.

WANG, K.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; YAN, J.; LI, J.; WANG, R. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, v. 29, p. 963-968, 2008.

WANG, K.R., YAN, J.X., ZHANG, B.Z., SONG, J.J., JIA, P.F., WANG, R. Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. **Cancer Letters**, v.278, p.65-72, 2009.

WANG, K., YAN, J., LIU, X.; ZHANG, J., CHEN, R., ZHANG, B., DANG, W., ZHANG, W., KAI, M., SONG, J., WANG, R. Novel cytotoxicity exhibition mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Toxicology**, v. 288, p.27-33, 2011.

WEIDMAN, P.J., WINTER, W.M. The G-protein-activating peptide, mastoparan and the synthetic NH₂-terminal ARF peptide, ARFp13, inhibit in vitro Golgi transport by irreversibly damaging membranes. **J. Biol. Chem.**, v.127, p.1815-1827, 1994.

ZALAT, S., SCHMIDT, J., MOAWAD, T.I. Lipase and phospholipase activities of Hymenoptera venoms (wasps and ants). **Egyptian Journal of Biology**, v.5, p.138-147, 2003.