AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO MASTOPARANO E DO VENENO BRUTO DA VESPA POLYBIA PAULISTA, EM CÉLULAS TUMORAIS - K562

Ana Carla Thomassewski (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Marcia Regina Paes de Oliveira, Carla Cristine Kanunfre (Orientador), e-mail: cckanunfre@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Biologia Geral/ SEBISA

Fisiologia 2.07.00.00-8 e Fisiologia Órgãos e Sistemas 2.07.02.00-0

Palavras-chave: mastoparano, anticancerígeno, linhagens tumorais.

Resumo

Os venenos são ricas fontes de compostos biologicamente ativos, como por exemplo, os peptídeos. O mastoparano-7 é um dos peptídeos encontrados, e inúmeras atividades biológicas têm sido atribuídas ao composto. Uma das recentes inovações relatadas sobre o mastoparano é a toxicidade que este desempenha em células tumorais. O desenvolvimento de novos fármacos antitumorais seletivos é um desafio na busca da cura do câncer. Desta forma o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a citotoxicidade do mastoparano em célula K562 comparando com o veneno bruto de *Polybia paulista* (vespa). Para tanto, foram realizados os tratamentos com diferentes concentrações do mastoparano (25 - 100 μM) e do veneno (20 - 200 μg/mL). A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de redução de MTT. O mastoparano se mostrou mais citotóxico que o veneno bruto reduzindo a viabilidade celular na maior concentração testada (100 μM – 142 μg/mL) em 66% comparado com 33,5% do veneno na concentração de (100 μg/mL). Para células K562 o mastoparano também foi antitumoral, todavia outros estudos precisam ser realizados para evidenciar tal efeito, bem elucidar o mecanismo de ação do composto.

Introdução

Embora a leucemia não seja o tipo de câncer que ocorre em maior frequência, esta doença apresenta altos índices de incidência e também de morte. (INCA, 2016). Das leucemias, a mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa crônica clonal. A incidência da LMC é de um a dois casos para cada 100 mil habitantes/ano e representa aproximadamente 15% de todas as leucemias. Classicamente, a doença evolui em três fases: crônica (FC), acelerada (FA) e crise blástica (CB)(BORTOLHEIRO et al., 2008).

A linhagem celular K562 é derivada de um paciente com LMC com crise blástica. Com base na possível presença do marcador celular da leucemia mieloide crônica, o cromossomo Ph, essas células, pertencentes à série de células granulocíticas e são consideradas como um ótimo modelo de estudo (KLEIN,1976).

Com o progresso das áreas de bioprospecção e biotecnologia voltadas para a saúde, hoje se exploram o uso de substâncias produzidas não somente por plantas, mas de diversos organismos como fungos, bactérias e também venenos de animais (GOMES et al*.,* 2010).

O veneno de vespas e abelhas são usados para defender a si próprios e suas larvas da ameaça de intrusos e/ou predadores de seus ninhos (MENDES et al*.,* 2004). Estes venenos são considerados ricas fontes de compostos biologicamente ativos, os quais contêm uma mistura complexa de aminas, pequenos peptídeos (mastoparanos) e enzimas (HABERMANN, 1972).

Atualmente, um dos principais problemas vivenciados por pacientes submetidos à quimioterapia são os severos efeitos colaterais e a resistência das células tumorais às drogas. Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos com diferentes mecanismos de ação é um grande desafio na cura do câncer.

Nos últimos trinta anos, os peptídeos antimicrobianos têm recebido crescente atenção por parte dos pesquisadores, por se mostrarem potenciais candidatos à produção de medicamentos cancerígenos. De fato, o mastoparano, como mencionado, é um peptídeo encontrado no veneno de vespas (SOUZA et al*.,* 2009) e pelo fato de já ter tido sua citotoxicidade descrita para linhagem de células tumorais (WANG et al., 2008), o presente trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade do mastoparano em célula K562 comparando com o veneno bruto de *Polybia paulista* (vespa).

Materiais e Métodos

Extração, obtenção e quantificação de proteína do veneno bruto:
Os ninhos de vespa foram coletados em agosto de 2017, em Ponta Grossa (PR), para o sacrifício,o ninho foi mantido por 48 horas a uma temperatura de – 20 °C. Foi realizado então o recolhimento das vespas do ninho, armazenando-as no freezer a mesma temperatura. Extraiu-se então 4500 (quatro mil e quinhentas) glândulas, dissecando o aparelho de inoculação do veneno, com o auxilio de uma pinça oftálmica. O veneno bruto foi obtido a partir da centrifugação (14.000 rpm) das glândulas de veneno após suave compressão , na presença de tampão salino fosfato (PBS). A quantificação das proteínas do veneno bruto se deu através do método de Azul de Coomassie, descrito por Bradford (1976).

Obtenção do mastoparano
O mastoparano-7 foi adquirido comercialmente da empresa Sigma®, código M212.

Cultura de células e condições de cultivo:
As células K562 foram cultivadas em RPMI 1640 pH 7,4, contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, suplementado com 24 $mmol.L^{-1}$ de bicarbonato de sódio, 2 mM de L^{-1}glutamina, 1mM de piruvato sódico e com 10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por litro. Mantidas na estufa umidificada a 37 °C com CO_2 a 5%.

Ensaio de citotoxicidade:
As células ($1x10^3$ células/ 100μL/ poço) nas condições acima foram tratadas com diferentes concentrações do mastoparano em (25 - 100 μM) e do veneno (20 - 200 μM) e a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de redução de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo). Este ensaio reflete a atividade das desidrogenases mitocondriais, por conseguinte, atividade metabólica celular.
Após 24 horas de tratamento foram adicionados 20μL de MTT (5 mg/ml) aos poços, as células foram incubadas em estufa por 6 horas, o sobrenadante foi desprezado, após centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, e sobre o precipitado celular adicionou-se 200μL de DMSO, homogenizou-se e realizou-se a leitura da placa no espectrofotômetro a 550nm.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Utilizando o Software estatístico PRISMA version 5, as comparações entre amostras foram obtidas por teste ANOVA one way, seguidos pelo pós-teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Baseado nos ensaios de citotoxicidade realizados em cultura de 24 horas, obtivemos resultados que demonstram que o veneno bruto extraído das vespas da espécie *P. paulista* e o composto isoldado mastoparano, que consiste em uma proteína isolada também de vespa (adquirido comercialmente), foram capazes de reduzir o crescimento/proliferação celular bem como induzir morte das células K562. Este resultado está demonstrado na Figura 1.

O veneno bruto reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 50 µg/mL, todavia a concentração de 100 µg/mL foi a mais efetiva, com redução da viabilidade celular de 33,5 % (Figura 1). O mastoparano, por outro lado, foi mais citotóxico, gerando uma redução acentuada da viabilidade celular na maior concentração testada (100 µM – 142 µg/mL) correspondente a 66% (Figura 1). A concentração de mastoparano que reduziu a viabilidade celular em 50% (IC_{50}) foi 52,61 ± 1,89 µM.

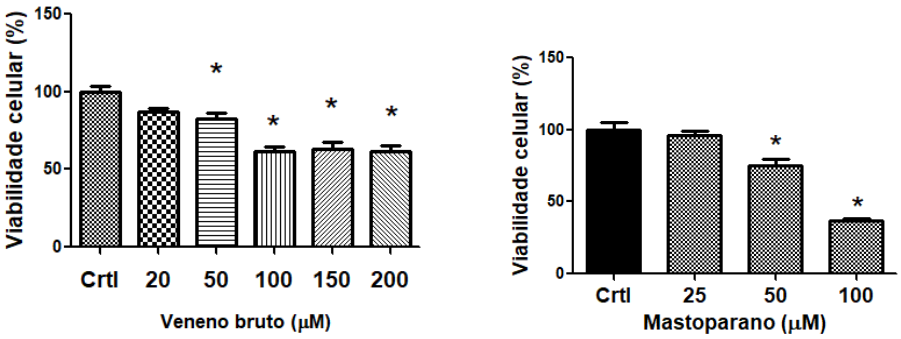


Figura 1. **Citotoxicidade do extrato do veneno bruto da vespa *Polybia paulista* e da proteína isolada mastoparano-7 sobre a linhagem tumoral K562.** Na figura, lado esquerdo, está demonstrada a viabilidade das células tratadas com o veneno bruto por 24 horas, com concentrações de 20-200 µg/ml. Do lado direito da figura está demonstrado a viabilidade das células tratadas com o mastoparano por 24 horas, com concentração de 25, 50 e 100 µg/ml. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão média de três experimentos independentes com n= 3 – 9 por experimento. O símbolo * significa diferença estatística em relação ao controle, definida por ANOVA one way e pelo pós-teste de Tukey.

O efeito de citotoxicidade do mastoparano e do veneno bruto de vespa foi também avaliado por microscopia óptica de luz (dados não mostrados). Observou-se um aglomerado de células arredondadas que se mantém em suspensão na cultura controle. Segundo Klein e colaboradores (1976), as células K562 são arredondadas e relativamente lisas, com um pequeno número de microvilosidades curtas quando avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Nos tratamentos de 24 horas com as diferentes concentrações, de mastoparano e, bem como veneno bruto, as células mudaram sua morfologia, perderam seu formato arredondado característico, reduziram o volume e, apresentaram maior número de grânulos.

Existem poucos trabalhos que relatam o potencial antitumoral do mastoparano. Azevedo e colaboradores (2015) realizaram um estudo utilizando mastoparano extraído do veneno da *Vespula lewisii* e observaram que este apresenta atividade antitumoral para a linhagem de melanoma humano B16F10, o

mastoparano obtido do veneno da *Vespa crabo* (European Hornet) também foi relatado como antitumoral para as linhagens tumorais de pulmão (H157), de próstata (PC-3), de mama (MCF-7) para melanoma (MDA-MB 4355) e glioma (U251MG) por Chen e colaboradores (2018). Do veneno de vespa social brasileira *Polybia paulista,* Wang e colaboradores (2008) utilizaram outro peptídeo e seus análogos e também observaram inibição da proliferação de células das linhagens de câncer de bexiga humana (Biu87) e câncer de próstata (PC-3). Esses trabalhos indicam que venenos de insetos, e em especial peptídeos como o mastoparano, são capazes de reduzir a viabilidade celular de linhagens tumorais, resultado que foi corroborado por este trabalho que utilizou o modelo experimental de leucemia.

Conclusões

Após os dados analisados nesse trabalho, foi possível concluir que o veneno bruto da vespa *Polybia paulista* e o mastoparano são citotóxicos para a linhagem de leucemia K562.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo suporte de pesquisa. À Fundação Araucária pela concessão da bolsa de IC. À minha orientadora Prof[a] Dr[a] Carla C. Kanunfre, por permitir a realização deste trabalho e à minha co-orientadora Prof[a] Dr[a] Márcia R. Paes de Oliveira, por toda ajuda na realização deste.

Referências

AZEVEDO, R. A., et al. Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity *in vivo*. **Peptides**, v. 68, p.113-119, 2015.

BORTOLHEIRO, T. C., et al. Leucemia Mieloide Crônica: história natural e classificação. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, suppl. 1, p. 3-7, 2008.

BRADFORD, M. A. A. rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-bonding. **Analytical Biochemistry** v.72, p.248-254, 1976.

CHEN, X., et al., Evaluation of the bioactivity of a mastoparan peptide from wasp venom and of its analogues designed through targeted engineering. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14(6), p.599-607, 2018.

GOMES, A., et al., Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian Journal of Experimental Biology**. India, v. 48, p. 93-103, 2010.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**. v. 177, p. 314, 1972.

KLEIN, E.,et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. **International Journal of Cancer**, v. 18, p. 4, 1976.

MENDES, M. A., et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v. 44, p. 67-74, 2004.

SOUZA, B. M., et al., Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**. São Paulo, v. 26, p. 2157-2164, 2009.

WANG,B., et al., Antitumor effects, cell selectivity and structure–activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**. v.29, p. 963 – 968, 2008.