

## **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA HEMOLINFA DE LARVAS DE ZOPHOBAS MORIO FABRICIUS (COLEOPTERA: TENEOBRIEDAE) EM FIBROBLASTOS HUMANOS.**

**Larissa Loponte Feijó; Gustavo de Jesus<sup>1</sup>; Francieli Marinho Carneiro<sup>1</sup>; Daniel Gonsales Spindola<sup>1</sup>; Carlos Rocha Oliveira.**

<sup>1</sup>Escola de Ciências da Saúde, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo/SP, Brasil.

<sup>2</sup>Professor da Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, Brasil.

Recebido em: nov. 2017; aceito ago. 2018; publicado out. 2018.

---

### **Resumo**

O aparelho digestivo dos insetos é formado basicamente por um longo tubo que percorre seu corpo no sentido longitudinal, desde a boca até o ânus, denominado canal digestivo ou alimentar. O espaço entre o canal alimentar e a paredes do corpo é chamado hemocele ou cavidade geral, e é grandemente ocupado por sangue (hemolinfa). Neste sentido, estudos apontam que a hemolinfa de alguns insetos, por conta da presença de substâncias com potencial farmacológico, apresenta potencial antibacteriano, antiviral, antifúngico, entre outros. Neste trabalho, avaliamos o efeito citotóxico da hemolinfa obtida, a partir da criação em laboratório, de larvas de *Zophobas morio* Fabricius (Coleoptera:Tenebrionidae), sobre fibroblastos dérmicos humanos (CCD1072Sk – ATCC), através dos ensaios de captação do corante Tetrazolium – MTT, método de exclusão do azul de tripano, quantificação de células nas diferentes fases do ciclo celular, através de citometria de fluxo e do ensaio *wound healing*, onde acompanhamos em tempo real a proliferação de fibroblastos. Os resultados obtidos mostraram que a hemolinfa de *Zophobas morio* Fabricius, não se mostrou citotóxica sobre a linhagem celular testada. Ao invés disso, na concentração de 10%, a hemolinfa se mostrou capaz de induzir proliferação dos fibroblastos ( $P < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** hemolinfa; citotoxicidade, *Zophobas morio* Fabricius.

---

### **Introdução**

Com a crescente demanda por novos produtos oriundos de fontes naturais para a utilização em tratamentos alternativos a diversas doenças, surge a necessidade de buscar aplicações em outras fontes de origem vegetal ou animal. Dentre as fontes animais, testes recentes realizados no ano de 2013 no Instituto Butantã, São Paulo, utilizando-se do fluido da hemocele encontrada em lagartas da espécie *Lonomia obliqua*, têm demonstrado fortes propriedades antivirais, onde estudos revelam

que algumas proteínas e peptídeos possuem ação antiviral por conta da sua capacidade de ligação à glicoproteínas encontradas na membrana celular, ou seja, quando essas células são expostas ao vírus, podem ocorrer interações de peptídeos e/ou proteínas com a membrana glicoproteica, impedindo assim a adsorção viral<sup>1</sup>. A proteína Lactoferrina (proteína ligante ao ferro), encontrada na hemolinfa, por conta de suas propriedades antivirais, antibactericidas, antitumorais, antifungicidas, imunoreguladoras e anti-inflamatórias<sup>2</sup>, fez com que a replicação do vírus da Herpes simples se tor-

nasse 1 milhão de vezes menor<sup>1,3</sup>. Já em lagartas da família *Megalopygidae*, tornou 2 mil vezes menor a replicação do Picornavírus (parente do vírus da Poliomielite) e 750 vezes menor a replicação do vírus do Sarampo, além de ter neutralizado o H1N1, da Influenza<sup>4</sup>.

Com função semelhante à do sangue, em insetos, a hemolinfa efetua a troca de produtos químicos com os órgãos, conduz hormônios, alimento elaborado e produtos de excreção, regula a pressão interna do corpo, ventila o sistema traqueal e reserva água, além de uma composição química é bastante diferente e é basicamente constituída por água, sais e compostos orgânicos<sup>5</sup>.

Ainda em relação à composição da hemolinfa, observa-se grande concentração de proteínas, lipídeos, aminoácidos livres e alta concentração de íons inorgânicos como Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Mg<sup>++</sup>, sendo que todos esses componentes aparecem em diferentes insetos e em diferentes quantidades de acordo com as fases do ciclo de vida, contribuindo para a manutenção do pH e da pressão osmótica do plasma<sup>6</sup>.

Estudos sugerem que a hemolinfa de insetos apresenta substâncias farmacologicamente ativas, e a isto, associa-se potencial antibacteriano<sup>7</sup>, antiviral<sup>3</sup>, imunoregulador<sup>8</sup>, fungicida<sup>9</sup> e anticongelante<sup>10</sup>, tornando-se assim, um potencial para o surgimento de novas ferramenta terapêuticas.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade da hemolinfa obtida de larvas de *Zophobas morio* Fabricius, através de métodos que envolvem a avaliação da viabilidade celular e de ensaios que possam indicar proliferação celular.

## **Materiais e Métodos**

### **Cultura celular**

As células da linhagem CCD - 1072Sk foram cultivadas em meio ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino, 0,292 g/L de L-glutamina, 1,0 g/L de D-glicose, 2,2 g/l de NaHCO<sub>3</sub>, 10.000UI de Penicilina e 0,060 g/l de Estreptomina. As células foram mantidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (1 × 10<sup>5</sup> cells/mL)

em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade com o corante azul de tripano e foi realizada a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular foi igual ou superior a 95%.

### **Extração da hemolinfa**

Para a extração da hemolinfa realizou-se uma pequena incisão na região dorsal anterior do primeiro segmento torácico, próximo à cabeça da larva, utilizando um bisturi descartável nº 12, com o intuito de atingir o vaso dorsal que passa pela região. A hemolinfa que extravasa pela incisão foi coletada em pequenas porções de 5 mm<sup>3</sup> com o auxílio de micropipeta, sendo diluída imediatamente em meio de cultura Iscove's, até atingir a concentração desejada para o teste.

### **Ensaio de viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano**

A avaliação da viabilidade das células na presença das diferentes concentrações de hemolinfa foi realizada através do método de exclusão de azul de tripano em fibroblastos. Assim, após incubação das células (1 × 10<sup>5</sup> células/mL) com diferentes diluições a hemolinfa (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%) por 24 horas, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio ISCOVE'S, suplementado em 20% com

Soro Fetal Bovino (SFB). Após isso, as células foram diluídas (1:10) em corante de azul de tripano e a contagem das células inviáveis foi realizada em Câmara Hemocitométrica (Câmara de Neubauer) utilizando microscópio óptico 400x.

### **Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT**

Para avaliar a viabilidade celular após tratamento com diferentes diluições da hemolinfa, foi utilizado o método colorimétrico do MTT. Para

o teste do MTT,  $1 \times 10^5$  de células foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença da hemolinfa (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%), por 24 horas e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços da microplaca 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>, e após 4 h de incubação com o MTT, foram acrescentados 50 µL SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10% diluído em HCl/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) será medida em espectrofotômetro. O valor de IC<sub>50</sub> (concentração em µM.L<sup>-1</sup> que inibe 50 % da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### **Ensaio de incorporação do iodeto de propídeo (PI)**

Foram realizados ensaios de incorporação do iodeto de propídeo (PI) para avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo. Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de vinte e quatro poços (densidade inicial em células/poço, de  $2 \times 10^5$ ) e a elas foi adicionada a solução fluorocrômica hipotônica (HFS – 0,1% p/v de citrato de sódio trissódico, 0,5% p/v de Triton-X 100 e 50 µg/ml de iodeto de propídeo). Após período de incubação de quatro horas, a 4°C e ao abrigo da luz, as células e o sobrenadante foram recolhidos e analisados. Foi utilizado o citômetro de fluxo FACScan, o programa CELLQuest e os dados obtidos, considerando-se 20.000 eventos por análise em cada ensaio, serão analisados no programa WinMDI 2.8.

#### **Wound healing**

Para a realização do ensaio *wound healing*, os fibroblastos foram semeados em microplacas de 6 poços e cultivadas conforme item 2.1 até o surgimento da monocamada confluenta.

As monocamadas de células foram cuidadosamente “riscadas” com a ponta de uma pipeta estéril, lavadas com solução salina e tampão fosfato.

Em seguida, as células foram incubadas a 37 °C com meio de cultura, sem soro fetal bovino (carenciamento) e com 10,0 % de hemolinfa. Os pontos de referência perto da fenda foram marcados para garantir a mesma área de aquisição de imagem. Estas foram obtidas em diferentes períodos por uma câmera digital acoplada ao microscópio e a porcentagem de fechamento foi calculada com o software IMAGEJ (NIH, EUA).

#### **Análise estatística**

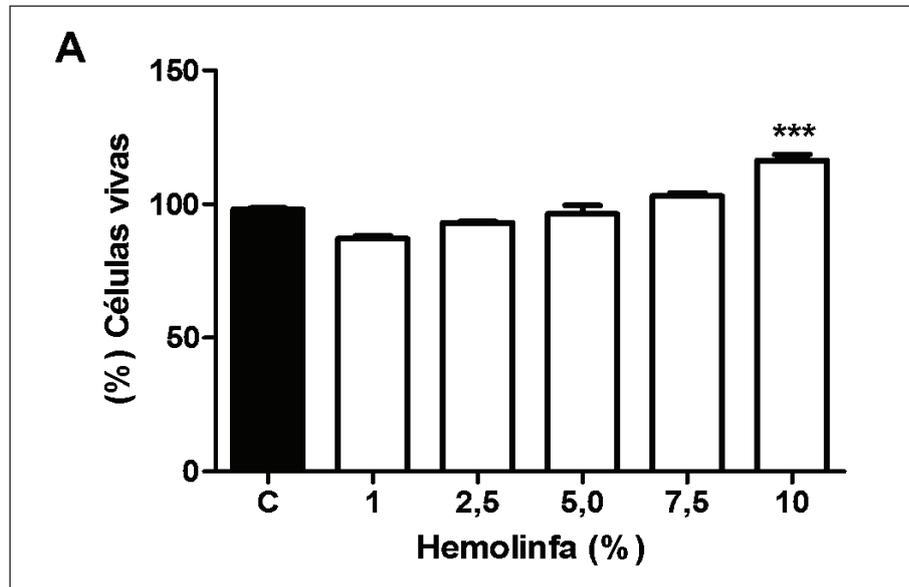
Para a análise dos dados foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e posterior o teste de comparação múltipla de Tukey, com significância de  $p < 0.05$ , para a comparação entre os grupos<sup>11</sup>. Foi utilizado o Software GraphPad-Prism V3.02. Para todos os grupos consideraram-se estatisticamente significativos valores de p menores que 0.05 ( $p < 0.05$ ).

#### **Resultados e Discussão**

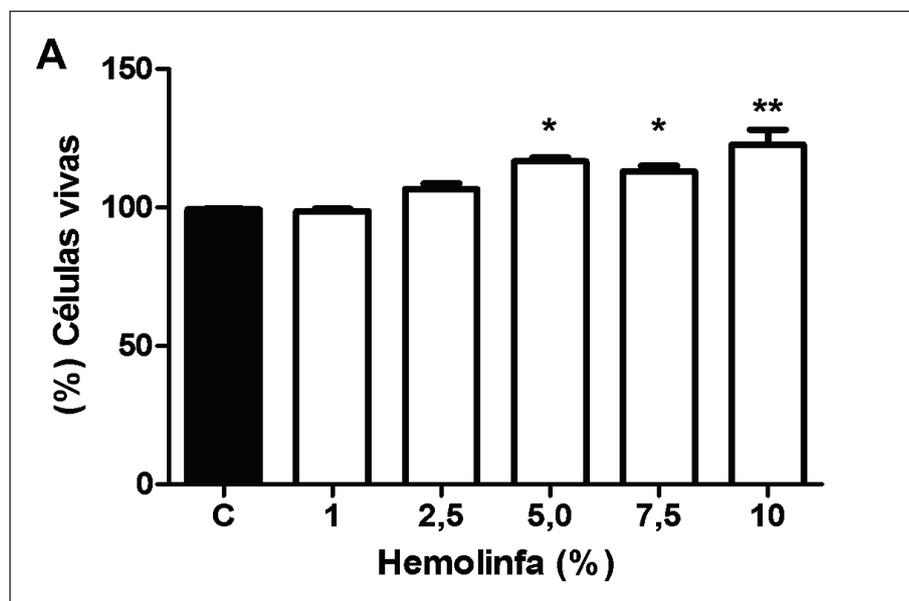
O teste de incorporação do azul de tripan permite detectar células inviáveis, que incorporam o corante por apresentarem danos na membrana corando-se em azul; enquanto que as células viáveis, por apresentarem membrana íntegra, bloqueiam a passagem do corante. Assim, após o tratamento com a hemolinfa, observamos uma tendência linear de proliferação dos fibroblastos testados. A figura 1 mostra a representação gráfica desse resultado e ainda indica que a maior concentração estudada (10%) apresentou aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle (células sem tratamento).

Já em relação ao teste de proliferação MTT, método descrito por Mosmann (1983)<sup>12</sup> que consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, a tendência de proliferação da hemolinfa sobre os fibroblastos testados, também foi observada. Contudo, ao contrário do teste de incorporação do azul de tripan, o qual indicou apenas uma concentração com sendo capaz de aumentar a proliferação de modo significativo, a figura 2 indica que não ape-

nas a concentração de 10% conseguiu aumentar significativamente o percentual de fibroblastos em comparação ao controle (células sem tratamento), mas também as concentrações de 5,0 e 7,5%.



**Figura 1.** Resultados da viabilidade celular através da técnica azul de trypan após 24 horas de exposição com diferentes concentrações de hemolinfa. Antes do início dos testes, as células foram carenciadas de soro fetal bovino. (\*\*\*)  $P < 0,001$  - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey, GraphPad PRISM v5.0.



**Figura 2.** Resultados da viabilidade celular através da técnica de MTT após 24 horas de exposição com diferentes concentrações de hemolinfa. Antes do início dos testes, as células foram carenciadas de soro fetal bovino. (\*)  $P > 0,05$  - significativo em relação ao controle. (\*\*)  $P > 0,01$  - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey, GraphPad PRISM v5.0.

A diferença dos resultados obtidos nos testes de MTT e azul de tripano podem ser explicadas ao menos em parte, pela diferença entre os princípios dos métodos, pois no caso do MTT, algumas células poderiam estar inviáveis quando observadas ao microscópio óptico (azul de trypan), mas ainda poderiam ter mitocôndrias capazes de reduzir o sal de MTT à formazan (princípio do método de MTT).

Como a atividade citotóxica foi praticamente descartada a partir dos resultados observados acima, onde observamos uma clara relação dose-dependente de proliferação dos fibroblastos, partimos para a verificação da atividade proliferativa da hemolinfa através da quantificação das fases do ciclo celular de fibroblastos tratados como a concentração de 10% de hemolinfa, cuja resposta proliferativa foi estatisticamente significativa em relação ao controle (células não tratadas) nos dois testes realizados anteriormente. Deste modo, a figura 3A, mostra a representação gráfica do percentual de células tratadas com diferentes concentrações de hemolinfa e que estão nas fases S-G2-M do ciclo celular quando comparadas ao controle não tratado.

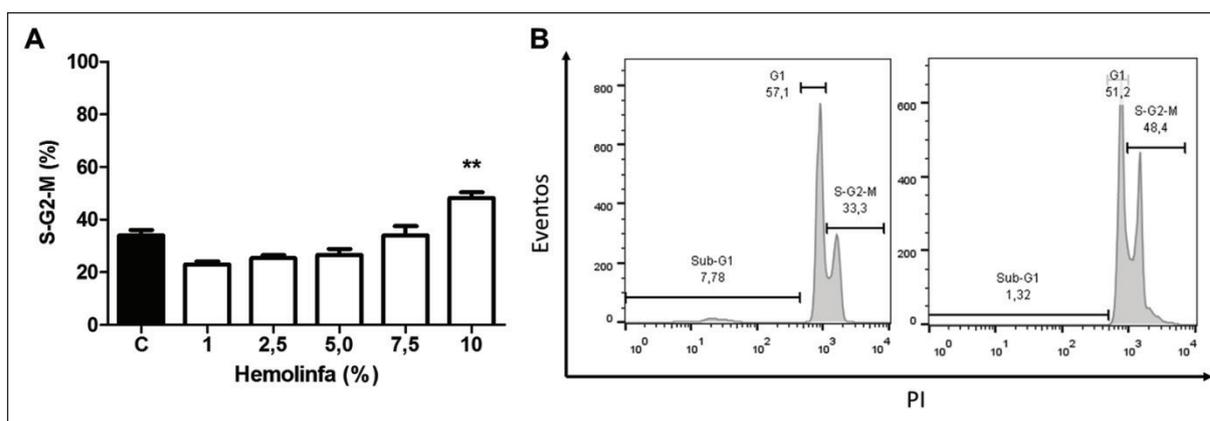
Por fim, após verificarmos que a concentração de 10% da hemolinfa foi capaz de induzir a proliferação dos fibroblastos, realizamos o ensaio *wound*

*healing*, com o objetivo de monitorar em tempo real, a proliferação dos fibroblastos mediante ao tratamento com 10% de hemolinfa (Figura 4).

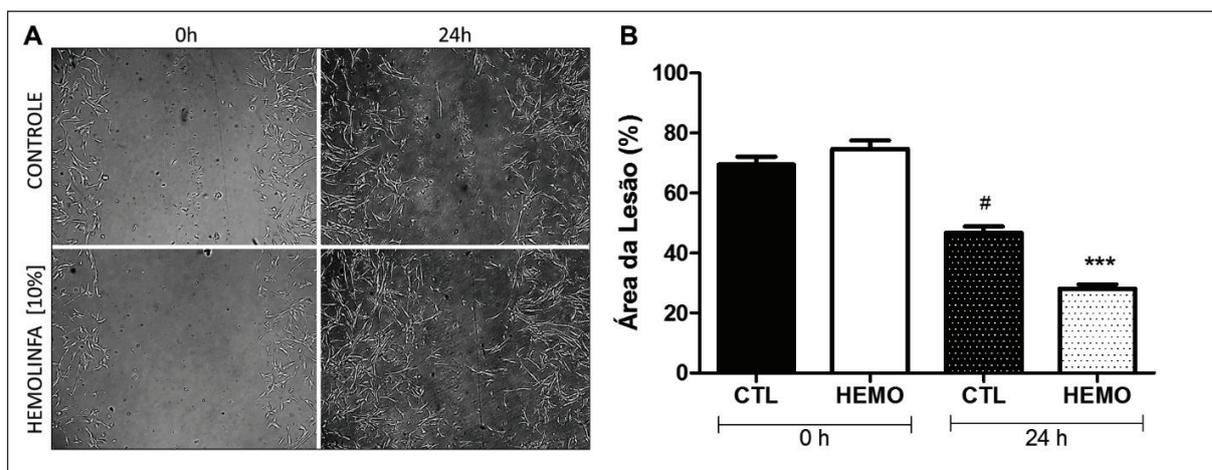
### Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a hemolinfa possui característica proliferativa, capacitando assim o crescimento e a viabilidade celular. Nenhum dos testes realizados foi capaz de observar citotoxicidade às células, inclusive em concentrações elevadas como a de 10%. Além disso, os métodos de redução do MTT e de exclusão pelo corante azul de trypan mostraram relação dose-dependente na proliferação dos fibroblastos. Também, verificamos que as células tratadas com 10% de hemolinfa, apresentaram percentual de células em fases S-G2-M, maior do que as células não tratadas (controle) e que no monitoramento em tempo real (*wound healing*) os fibroblastos tratados também conseguiram ocupar a área livre de modo significativamente maior do que células não tratadas.

Por fim, novos testes devem ser realizados para esclarecer os mecanismos proliferativos da hemolinfa a fim de que possam auxiliar na busca por novas formas de auxílio terapêutico.



**Figura 3.** (A) Percentual de células em fase S-G2-M obtidos após exposição por 24 horas de diferentes concentrações de hemolinfa sobre linhagem de fibroblastos humanos. Antes do início dos testes, as células foram carentes de soro fetal bovino. (\*\*\*)  $P > 0,05$  - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey. GraphPad PRISM v5.0. (B) Histograma representativo da concentração com significância estatística (10%), Flow Jov 10.0.



**Figura 4.** (A) Representação fotográfica das amostras *in vitro* submetidas à simulação de lesão e expostas por 24 horas a hemolinfa na concentração de 10%. (B) Gráfico representativo do percentual da área da lesão nos tempos de 0h e 24h após mesmo tratamento. Antes do início dos testes, as células foram carenciadas de soro fetal bovino. (#)  $P > 0,05$  - significativo em relação ao grupo controle 0h. (\*\*\*)  $P > 0,05$  - significativo em relação ao grupo 0h tratado com hemolinfa, Teste t de Student, GraphPad PRISM v5.0.

## Referências bibliográficas

1. Andersen, JH; Jenssen, H; Sandivik, K; Gutteberg, TJ.; **Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface**; Journal of Medical Virology, Vol. 74, 2004.
2. Vogel, HJ; Schibli, DJ; Jing, W; Lohmeier-Vogel, EM; Epanand, RF; Epanand, RM.; **Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides**; Biochem Cell Biol. 2002.
3. Greco, KN.; **Estudo de Proteínas obtidas da Hemolinfa de *Lonomia obliqua* com ação antiviral**; Universidade de São Paulo, 2009, pag 23.
4. IPDFarma ; **Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Produtos Farmacêuticos, Vacina de Lagarta, 2013**; Disponível em: <http://www.ipd-farma.org.br/noticias/pagina/568/Vacina-de-lagarta>
5. Lara, FM.; **Princípios de Entomologia; 3ªEd., São Paulo, Ícone, 1992. Pags83,84.**
6. Rafael, JA; Melo GAR; Carvalho, CJB; Casari, AS; Constantino, R.; **Insetos do Brasil- Diversidade e Taxonomia**; 2012, pags 65.
7. Zhu S; Li W; Jiang D; Zeng X.; **Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom**; IUBMB Life, 2000.
8. Jones, G; Manczak, M; Horn, M.; **Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis**; The Journal of Biological Chemistry, 1993.
9. Martins, LM.; **Efeito de uma proteína antiapoptica obtida da hemolinfa da *Lonomia obliqua* sobre as mitocôndrias de células Sf-9**; Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2011, pags 16,17, 25.
10. Peters, ID; Rancourt, DE; Davies, PL; Walker, VK.; **Isolation and characterization of an antifreeze protein precursor from transgenic *Drosophila*: evidence for partial processing**; Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Canadá, 1993.
11. Callegari-Jacques, SM.; **Bioestatística: Princípios e Aplicações**; Porto Alegre, Artmed, 2003, pags 157, 158 e 159.
12. Mosmann, T.; **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**; Journal of Immunological Methods, 1983.