UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Imunogenicidade do veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae)

Flávia Assumpção Santana

Uberlândia – MG
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Imunogenicidade do veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae)

Flávia Assumpção Santana

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica – Área de Concentração: Genética

Uberlândia – MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S232i Santana, Flávia Assumpção, 1978-

Imunogenicidade do veneno *de Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) / Flávia Assumpção Santana. - 2008.
77 f. : il.

Orientador: Ana Maria Bonetti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética molecular - Teses. I. Bonetti, Ana Maria.II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.21

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Palavras chave: *Dinoponera australis*, veneno, citocinas, *phage display*, TLR4

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Imunogenicidade do veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae)

Flávia Assumpção Santana

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Ana Maria Bonetti (orientador)

Examinadores: Dra. Maria Izabel Camargo Mathias
Dr. Mauricio Bacci Junior
Dr. Carlos Ueira Vieria
Dr. Luiz Ricardo Goulard Filho

Data da Defesa: 28 / 07 / 2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas

_____

Dra.Ana Maria Bonetti

Dedicatória

Aos meus pais, Santana e Odete, por todo o amor, carinho e incentivo durante todos os momentos de minha vida.
As minhas irmãs Fernanda e Fabiola por estarem presentes na minha vida.
Ao amor, que me ilumina
dedico.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, infinita bondade, e o amor.

À Dra. Ana Maria Bonetti, por mais uma vez ter aceitado me orientar.

Ao Dr. Carlos Ueira Vieira, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelas idéias, pelos gestos de amizade e confiança, pelas sugestões feitas na correção da tese. Obrigada por ter participado efetivamente no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. David Nascimento Silva Teixeira pela ajuda nas análises de citocinas

Aos amigos dos laboratórios de Genética, Biologia Molecular e Bioquímica pelo apoio, colaboração, força, paciência e amizade durante este tempo de convivência.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica, pelos ensinamentos e ajuda emprestando equipamentos e materiais.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo

Aos recursos financeiros concedidos pela CAPES, CNPq, FAPEMIG , UFU e UEG sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Sumário

Sumário de Figuras ..... *ii*
Sumário de Tabelas ..... *iv*
Lista de Abreviatura ..... *v*
Lista de Abreviatura para Aminoácidos ..... *vi*
Apresentação *7*
Capitulo 1: Fundamentação Teorica *9*
Dinoponera australis (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) *9*
Dinoponera australis 10
O veneno 12
Referência Bibliográfica *15*
Capitulo 2 ..... *19*
Identificação de peptídeos do veneno de Dinoponera australis (Hymenoptera, Formicidae Ponerinae) por meio de Phage Display *19*
Resumo 20
Abstract 21
Introdução 22
Material e Métodos 24
Material Biológico 24
Extração do veneno 24
Obtenção de anticorpo Policlonal 24
Purificação dos anticorpos policlonais 25
Seleção de fagos ligantes aos anticorpos 25
Titulação 26
Extração de DNA de fago em placa *deepwell* 27
Seqüenciamento 27
Bioinformática 28
Amplificação de fagos 28
Detecção de Atividade Enzimática 29
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 29
Imunização de camundongos 30

Teste de Edema 30
Resultados e Discussão 31
Referência Bibliográfica 44
Capitulo 3: *50*
EFEITOS DO VENENO DE Dinoponera australis (HYMENOPTERA,FORMICIDAE, PONERINAE) NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS SANGUINEAS, IN VITRO *50*
Resumo 51
Abstract 52
Introdução 53
Material e Métodos 55
Material Biológico 55
Extração do veneno 55
Obtenção e cultivo de sangue periférico 55
Obtenção e cultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) 56
Viabilidade celular 56
Dosagem de citocinas por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 57
Análise estatística 58
Extração de RNA e síntese de cDNA 58
Quantificação relativa de mRNA TLR4 por PCR Tempo Real 59
Resultados e Discussão 60
Conclusões Gerais 66
Referencia Bibliográfica 67

Sumário de Figuras

Capitulo 1

Figura 1: Operária de *D. australis* carregando sua presa.....**11**
Figura 2: Diagrama da anatomia da glândula de veneno de *Dinoponera australis.* Túbulos de secreção (ST), reservatório de veneno (R), glândula convoluta (CG) e ducto de veneno (D). (Schoeters e Billen,1995).....**14**

Capitulo 2

Figura 1: Região de maior similaridade entre os peptídeos selecionados por phage display através do programa match e ADAM metaloprotease de *Culex quinquefasciatus.* **36**
Figura 2: Região de maior similaridade entre os peptídeos selecionados por phage display através do programa match e fosfatase ácida de *Nasonia vitripennis.* **37**
Figura 3: Mapeamento de epítopos de proteínas de veneno de himenópteras utilizando os peptídeos selecionados por *phage display* através do programa match. A - hialuronidase de *Nasonia vitripennis*, B- fenoloxidase de *Pimpla hypochondriaca* C – Fosfolipase de *Nasonia vitripennis.* **41**
Figura 4: Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio ELISA mostrando a reatividade dos clones analisados.....**42**
Figura 5: Médias dos edemas induzidos em patas de camundongos imunizados nos diferentes tratamentos ao longo do tempo. **43**

Capitulo 3

Figura 1: redução do MTT por PBMC estimulada com diferentes concentrações de veneno de *D. australis.* * representa diferença significativa entre a amostra e controle (p<0,05). **60**

Figura 2: Quantificação de IL10 produzida por cultura de sangue periférico após 24h de estimulo com veneno de bruto de *D. australis*. * representa diferença significativa entre a amostra e controle (p<0,05)**.....61**
Figura 3: Quantificação de TNF-α produzida por cultura de sangue periférico após 24h de estimulo com veneno de bruto de *D. australis*. * representa diferença significativa entre a amostra e controle (p<0,05)**.....62**
Figura 4: Quantificação de IL12p40 produzida por cultura de sangue periférico após 24h de estimulo com veneno de bruto de *D. australis* * representa diferença significativa entre a amostra e controle (p<0,05)**.....62**
Figura 5: Níveis relativos de transcritos do gene TLR4 detectados por PCR em tempo real em células mononucleares humanas. * representa diferença significativa entre a amostra e controle (p<0,05)**.....64**

Sumário de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1: Seleção dos fagos com peptídeos do veneno de *D. australis*. Título obtido (pfu) no processo de seleção. 31

Tabela 2: Seqüência dos peptídeos identificados pelo programa DNA2PRO, e a freqüência observada de cada peptídeo. 32

Tabela 3: Análise de bioinformática dos peptídeos selecionados por *Phage Display* em veneno de *D. australis* contra proteínas de veneno de insetos. 33

Tabela 4: Avaliação da atividade enzimática do veneno de *D. australis* pelo kit Api-Zym (Bio Mèrieux). Os valores de 0 a 5 representam as notas aplicadas a cada reação, conforme carta de cores do fabricante. Notas acima de 3 indica reatividade. 38

Tabela 5 : Mapeamento dos componentes do veneno de *D. australis* utilizando o programa MATCH 40

Lista de Abreviatura

µg	Micrograma
µL	Microlitros
BSA	Soro albumina bovina
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
HPRT	Transferase do fosforibosil hipoxantina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Cloreto de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
Ng	Nanograma
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano
PEG	Polietileno glycol
Pfu	Unidades formadoras de colônias
pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
RPMI	Meio de cultura: Roswell Park Memorial Institute
Th1	Célula T helper 1
TLR4	Receptor Toll-like 4
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α-D-galactosideo

Lista de Abreviatura para Aminoácidos

Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Ácido glutâmico	E
Glutamina	Q
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Tirosina	Y
Valina	V

Apresentação

A formiga *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) é uma formiga basal, que se alimenta de outros insetos, vive em ninhos subterrâneos de 50 a 120 cm de profundidade, com média de 14 operárias por colônia.

A presença da glândula de veneno é outra característica de destaque em *D. australis*. O veneno de himenóptera pode desencadear reações alérgicas sérias em humanos. Muitas substâncias com propriedades terapêuticas já foram isoladas do veneno de diferentes animais e têm sido amplamente utilizadas em pesquisas básicas e no entendimento de mecanismos inflamatórios e antiinflamatórios. Nos himenópteros, o estudo ocorre, principalmente, em *Apis mellifera*, portanto, há poucas informações sobre o veneno de formigas.

Há poucos estudos sobre a ecologia, comportamento ou qualquer outro aspecto da biologia das espécies do gênero *Dinoponera*. Este fato tem estimulado a busca de informações sobre sua biologia e comportamento, para acrescentar dados científicos, que embasem a pesquisa de himenópteros na região do Triângulo Mineiro.

O conhecimento da composição e das propriedades do veneno de *D. australis* ainda é limitado, principalmente, por haver dificuldade na obtenção de amostras suficientes para análises químicas e biológicas.

Este trabalho buscou conhecer, algumas características imunogênicas do veneno de *D. australis*. Para isso foram desenvolvidas duas pesquisas que estão mostradas nos dois capítulos a seguir.

O primeiro capítulo teve como objetivo selecionar peptídeos recombinantes miméticos do veneno de *D. australis* por *Phage Display* e identificar os prováveis alvos protéicos por similaridade.

O segundo capítulo, objetivou o estudo do perfil de citocinas em células sanguíneas humanas estimulada, *in vitro,* por veneno de *Dinoponera australis* e analisar a expressão do receptor Toll-like 4 em células mononucleares do sangue periférico humano.

Capitulo 1

Fundamentação Teorica

Dinoponera australis

(Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae)

Dinoponera australis

A subfamília Ponerinae está entre as mais primitivas da região neotropical, tanto por sua morfologia como pelo seu comportamento. As Ponerinae estão distribuídas por todo o mundo, porém são mais abundantes nas regiões tropicais. As formigas dessa subfamília são geralmente predadoras e possuem ferrão funcional.

Dentro da subfamília Ponerinae encontra-se o gênero *Dinoponera* que contém seis espécies, todas com distribuição pela América do Sul, entre elas a maior formiga do mundo *D. gigantea* que pode chegar a medir mais de 4,5 cm de comprimento (Caetano et al., 2002).

Neste gênero não há distinção entre as fêmeas reprodutivas e a reprodução é garantida por operárias fertilizadas, chamadas garmegates (Peeters, 1993, 1997; Monnin e Peeters, 1998; Mariano et al., 2004). As fêmeas jovens das colônias formam uma hierarquia baseada em interações agressivas cujo resultado é a cópula, somente, da fêmea dominante (alfa). Durante a cópula a fêmea corta com suas mandíbulas a região distal do macho que funciona como um tampão, impedindo a cópula com outros machos. As colônias de *D. australis* e *D. quadríceps* são monogínicas e monoândricas. (Monnim e Peeters, 1998).

Há poucos estudos sobre a ecologia, comportamento ou qualquer outro aspecto da biologia das espécies desse gênero. Entre eles encontra-se o trabalho de Morgan (1993) que estudou vários aspectos de forrageamento, alimentação e comportamento de nidificação de *D. longipes.* Em 2004, Mariano et al. reportaram o cariótipo de *D. lucida* com 2n = 106 cromossomos, representando a espécie de maior número de cromossomos dentre os himenópteros já estudados.

Dinoponera australis (Figura 1) vive em colônias relativamente pequenas (média de 14 operárias por colônia), forrageiam isoladamente capturando artrópodes de tamanho médio que vive na serrapilheira. Podem ser agressivas com membros de colônias adjacentes, aumentando a agressividade de acordo com a distância entre as colônias (Fowler, 1985; Paiva, 1992). As colônias apresentam ciclo reprodutivo anual que se inicia com a postura no mês de agosto e termina com a eclosão das últimas pupas no mês de março. Entre março e agosto as colônias não produzem ovos (época fria e seca do ano), ficando as

operárias fecundadas com os ovários inativos, não apresentando oocitos em desenvolvimento (Paiva, 1997).

Figura 1: Operária de *D. australis* carregando sua presa (Fonte: Siquieroli, 2007)

Formigas *D. australis* possuem aparelho estridulador, com o qual produzem um som bastante forte, que pode ser ouvido a mais de 50 cm. O significado do som ainda é desconhecido (Caetano et al., 2002)

O ninho de *D. australis* chega até 2 metros de profundidade com diversas câmaras dispostas ao longo de uma galeria. Os ninhos abrigam uma fauna inquilina, que vive, principalmente, na câmara de lixo, sendo espécies detritívoras (Paiva e Brandão,1995);

Os trabalhos de Paiva e Brandão (1995, 1997) revelam que espécies de *Pheidole* co-habitam ninhos de três espécies diferentes de *Dinoponera* aproveitando-se de restos alimentares. Em *D. australis* foi verificado que esta relação é espécie específica (Paiva e Brandão,1995).

O veneno

Animais peçonhentos são aqueles que produzem substância tóxica e apresentam um aparelho especializado para inoculação desta substância, que é o veneno. Possuem glândulas que se comunicam com dentes ocos, ferrões ou aguilhões, por onde o passa o veneno (Instituto Butantan, 2005).

Dentre os invertebrados encontra-se uma grande diversidade de animais que possuem aparatos de veneno tão ou mais eficientes que alguns vertebrados (Meier, 1995). É o caso, de alguns artrópodes como aranhas e escorpiões e alguns insetos, particularmente aqueles que pertencem à ordem Hymenoptera (Barnes, 1996).

O veneno de Hymenoptera sociais é conhecido desde o final do século XIX, mas pouco se sabe sobre a composição, propriedades farmacológicas, mecanismo de ação e alergenicidade da maioria desses venenos. Um fator limitante é a obtenção de quantidade elevada de veneno (Palma e Brochetto 1999). Os estudos têm se concentrado em um pequeno numero de espécies, selecionando-as de acordo com a importância e facilidade de manutenção (Owen, 1977).

A composição e a anatomia do aparato do veneno de Hymenoptera fazem correlação com o comportamento desses insetos (Edson et al., 1982; Edson e Vinson, 1979; Hermann e Chao, 1983; Van Marle e Pier, 1986), por exemplo, auxiliam na comunicação social – através de componentes voláteis, na captura de presa (Schmidt, 1986), na proteção do ninho contra predadores (Nakajima, 1984) e na prevenção do desenvolvimento de doenças em suas colônias (Orivel et al., 2001).

O veneno dos himenópteros é constituído de complexos de moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos, aminas vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e algumas enzimas como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (Edstron, 1992; Lima e Brochetto-Braga, 2003).

Análise das proteínas do veneno é importante por ser uma fonte rica de informação sobre a função e mecanismos biológicos do veneno (Leluk et al., 1989). O veneno é importante, também, por desencadear reações alérgicas em

humanos (Hoffman, 1996) e por apresentar aplicações terapêuticas (Lewis e Garcia, 2003).

Peptídeos, alcalóides sintéticos e peptídeos têm sido isolados de diversos animais a fim de testar a propriedade antimicrobiana destes compostos (Zelezetsky, 2005; Corzo et al,. 2002; Haeberli et al., 2000; Jouvenaz et al., 1972 ; Li et al., 2000; Mendes et al., 2004; Subbalakshmi et al., 1999).

Os estudos mais extensivos da caracterização de veneno, dentre os himenópteros, são os do grupo das abelhas sociais, principalmente *Apis*, algumas vespas sociais (*Vespula*, *Vespa* e *Polistes*) e de formigas (Blum, 1978) principalmente as subfamílias Myrmicinae, Ponerinae e Formicinae.

O conhecimento sobre a composição e propriedades dos venenos formiga é ainda limitado, pois existe uma grande dificuldade na obtenção de veneno suficiente amostras para análise química, e a composição varia consideravelmente entre as diferentes subfamílias formiga (Fundenberg et al,1980; Edstrom, 1992).

Em Apidae, o veneno desempenha importante papel na defesa da colônia e possui um potencial terapêutico de grande valor, particularmente em estudos de reumatismos e artrite. Algumas substâncias também têm sido amplamente utilizadas em pesquisas básicas sobre propriedades das membranas biológicas naturais e sintéticas e no entendimento de mecanismos antiinflamatórios (Banks e Shipolini, 1986).

Pesquisas mostraram que o veneno de formigas da subfamília Formicinae é constituído de mistura de ácidos orgânicos, enquanto das subfamílias Ponerinae e Myrmicinae é uma mistura complexa de proteínas e neurotoxinas. (Edstrom,1992; Horffman,1996) .

Morfologicamente, a glândula de veneno (Figura 2) de *D. australis* consiste de uma porção secretora externa, composta por um filamento secretor que bifurca a fim de dar lugar a outros dois filamentos; uma porção secretora interna, representada pela glândula convoluta, e uma porção de armazenamento, representada por um saco em forma de reservatório. (Ortiz e Camargo - Mathias, 2006).

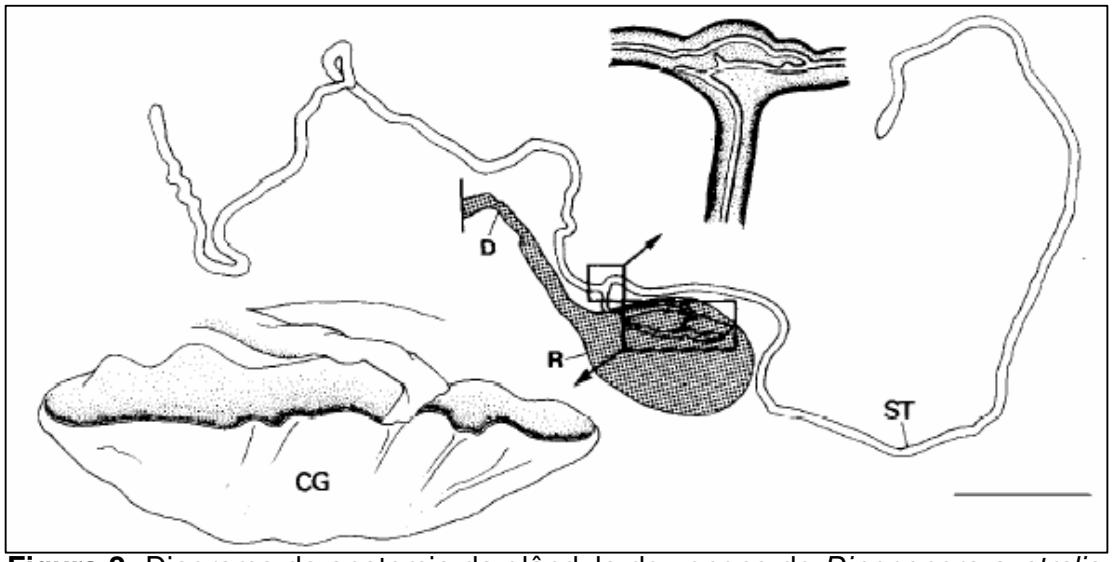

Figura 2: Diagrama da anatomia da glândula de veneno de *Dinoponera australis.* Túbulos de secreção (ST), reservatório de veneno (R), glândula convoluta (CG) e ducto de veneno (D). (Fonte: Schoeters e Billen,1995)

Referência Bibliográfica

Banks, B.E.C., Shipolini, R.A., 1986. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. In: Piek, T., (ed). Venoms of Hymenoptera: Biochemical, pharmacological and behavioral aspects. Academic Press. London, pp. 329 – 416.

Barnes, R.D., Ruppert, E.E., 1996. Zoologia dos Invertebrados. Editora Roca. São Paulo, 1029 p.

Blum, M.S., 1978. Biochemical defenses of insects. In: M. Rockstein (ed). Biochemistry of insects. Academic Press. London, pp. 465-513.

Caetano, F.H., Jaffé, K., Zara, F.J., 2002. Formigas: Biologia e Anatomia. F.H.C. Rio Claro, 42 p.

Corzo, G., Villegas, E., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., Belokoneva, O.S., Nakajima, T., 2002. Oxyopinins, large anphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. J. Biol. Chem. 277 (26), 23627-23637.

Edson, K.M. and Vinson, S.B., 1979. A comparative morphology of the venom apparatus of female Braconids (Hym: Braconidae), Can.Ent., 111: 1013-1024.

Edstrom, A., 1992. Venomous and poisonous animals**.** Krieger Publishing Company. Malabar. 210p.

Fowler H.G., 1985. Populations foraging and territoriality in *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae). Revi. Brasileira de Entomologia 29, 443-447

Haeberli, S., Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., Nentwig, W., 2000. Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Aranae: Ctenidae). Toxicon. 38, 373-380.

Hermann, H.R., and Chao J.T., 1983. "Furcula, a major component of the hymenopterous venom apparatus." Int. J. Insect Morphol. Embryol. 12:321-337.

Hoffman, DR., 1996. Hymenoptera venom proteins. Nat. Toxins. 2, 169-186.

Instituto Butantan., 2005. Acidentes por animais peçonhentos. Disponível em: < http://www.butantan.gov.br/novapagina/perguntas>. Acessado em: 03 jan. 2007.

Jouvenaz, D.P., Blum, M.S., MacConnel., 1972. Antibacterial activity of venom alkaloids from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 2 (4), 291-293.

Leluk, K., Schmidt, J., Jones, D., 1989. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. Toxicon. 27 (1), 105-114.

Lewis, R.J., Garcia, M.L., 2003. Therapeutic potential of venom peptides. Nature Reiews Drug Discovery. 2, 790-802.

Li, M.L., Liao, R.W., Qiu, J.W., Wang, Z.J., Wu, T.M., 2000. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparam M. International Journal of Antimicrobial Agents. 13, 203-208.

Lima, P.R.M., Brochetto-Braga, MR., 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera***.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 9 (2), 149-162.

Mariano, C.S.F., Delabie, J.H.C., Ramos, L.S., Lacau, S., Pompolo, S.G., 2004. *Dinoponera lúcida* Emery (Formicidae: Ponerinae): the highest number of chromosomes known in Hymenopetra. Naturwissenschaften. 91, 182-185.

Meier, J., 1995. Venomous and Poisonous Animals – A Biologist's View. In: Meier, J., White, J., (eds). Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**.** CRC Press. London, pp. 1-8.

Mendes, M.A., Souza, B.M., Marques, M.R., Palma, M.S., 2004. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. Toxicon. 44, 67-74.

Ministério do Meio Ambiente., 2005. Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção, Brasil. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acessado em: 10 jan. 2007.

Monnin, T., Peeters, C., 1998. Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadriceps*. Animal Behaviour. 55, 299-306.

Monnin, T., Peeters, C., 1999. Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. Behav Ecol 10, 323-332.

Morgan, RC., 1993. Natural history notes and husbandry of the Peruvian giant ant *Dinoponera longipes* (Hymenoptera: Formicidae). Invertebrates in Capitivity Conference Proceedings. Disponível em:<http://www.sasionline.org/antsfiles/pages/dino/Husbandry.html>. Acessado em: 03 jan. 2007.

Nakajima, T., 1984. Biochemistry of vespid venoms. In: Tu, AT., (ed.). Handbook of Natural Toxins. Marcel Dekker, New York, vol. 2, pp. 109-133.

Orivel, J., Redeker, V., Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., Rossier, J., 2001. Ponericins, New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. Journal of Biological Chemistry. 286 (21), 17823-17829.

Ortiz, G., Camargo Mathias, M.I., 2006. Venom gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae). Ultrastructural characterization. Micron 37, 243-248.

Owen M.D., 1977. insects venoms: identification of dopamine and noradrenaline en wasp and bee stings. Experiential 27:544-546

Paiva, R.V.S., Brandão, C.R.F., 1995. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the true giant queenless ponerine ant *Dinoponera* Roger (Hymenoptera: Formicidae). Ethol Ecol Evol. 7,297–312

Palma, M.S, Brochetto-Braga M.R., 1999. Venenos de hymenoptera sociais; coleta, composição, bioquímica e mecanismos de ação. In Barravieira, B. venenos- aspectos clinicos e terapeuticos dos acidentes por animais peçonhentos EPUB. 251-258.

Peeters C., 1997 Morphology "primitive" ants: comparative review of social characters and the importance of queen-worker dimorphism. In/; Choe, J.C and Crespi B.J Social behavior in insects and arachnids, London Cambridge University Press 391p.

Peeters, C., 1993. Monogyny and polygyny in ponerine ants and without queens. In: Keller, L. (ed) 1993. Queen number and sociality in insects. Oxford, Oxford University Press.

Schmidt, J.O., 1986. Biochemical, Pharmacological and Behavioral Aspects of ant venoms In: Piek, T., (ed.). Venoms of the Hymenoptera**.** Academic Press, New York, pp. 425-508.

Subbalakshmi, C., Nagaraj, R., Sitaram, N., 1999. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of analog with improved antibacterial activity. FEBS Letters. 448, 62-66.

Van Marle, J. and Piek, T., 1986.Morphology of the venom apparatus,In: Venoms of the Hymenoptera. (Piek, T., Ed.), Academic Press,New York, 1-16.

Capitulo 2

Identificação de peptídeos do veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae Ponerinae) por meio de *Phage Display*

Resumo

O gênero *Dinoponera* apresenta seis espécies, todas com distribuição pela América do Sul. Essas formigas são caracterizadas pela presença de uma glândula de veneno que é responsável pela produção de uma toxina, constituída em sua maior parte por proteínas. Este trabalho teve como objetivo a identificação de peptídeos específicos do veneno de *D. australis* por *Phage Display*. Foi utilizada biblioteca comercial de peptídeos randômicos *Ph.D.-12 Peptide 12-mer Phage Display Library.* Após quatro etapas de seleção, 48 clones tiveram sua seqüência de DNA determinada e foram traduzidos, gerando 26 seqüências válidas e 16 peptídeos distintos. As análises de bioinformática identificaram similaridade com ADAM metaloprotease de *Culex quinquefasciatus* e com uma proteína similar a fosfatase ácida de veneno encontrada em *Nasonia vitripennis*. ADAM metaloproteases são proteínas que atuam no controle de adesão e fusão de membrana, citocinas e fator de crescimento. Fosfatase ácida é uma das maiores enzimas lisossomais de invertebrados associada com degradação e morte celular. A atividade da Fosfatase ácida no veneno desta formiga foi feita utilizando o Kit Api Zym. O mapeamento dos componentes do veneno de *D. australis*, mostrou que os peptídeos analisados não apresentam similaridade com: melitina de *Apis mellifera* e *Vespa magnifica*; maior alergeno de *Myrmecia pilosula;* Apamin de *A. melífera*; fosfolipase A2 de *A. melífera*, mas apresentou similaridade com fosfolipase A2 de *Nasonia vitripennis*. Apresentou, também, similaridade com diferentes alergenos, neurotoxinas, metaloproteases, fenoloxidase e hialuronidase de diferentes himenópteros. Para analisar o efeito dos peptídeos usou se o teste edematogênico verificando que nos camundongos imunizados apresentou maior nível edematogênico com 30 minutos, sendo, portanto, mais rápido que em camundongos não imunizados.

Palavras-chave: *Phage Display*, veneno, *Dinoponera australis*.

Abstract

The *Dinoponera* presents six species, all with distribution by South America. These ants are characterized by the presence of a venom gland, which is responsible for the production of a toxin, consists for the most part by proteins. This work was aimed at the identification of specific peptides of the venom of *D. australis* by *Phage Display*. It was used commercial library of random peptides Ph.D.-12 Peptide 12-mer Phage Display Library. After four stages of selection, 48 clones had their DNA sequence determined and have been translated, generating 26 valid sequences and 16 different peptides. Analyses of bioinformatics identified similarity with ADAM metaloprotease of *Culex quinquefasciatus* and with a protein similar to acid phosphatase of venom found in *Nasonia vitripennis*. ADAM metalloproteases are proteins that act in control of accession and of membrane fusion, cytokine and growth factor. Acid Phosphatase is one of the largest of invertebrates Lysosomal enzymes associated with degradation and cell death. The activity of Phosphatase acid in this ant venom was made using the kit Api Zym. The mapping of the components of the venom of *D. australis*, showed that the peptides tested not have similarity to: mellitin of *Apis mellifera* and *Vespa magnifica;* largest allergen of *Myrmecia pilosula*; Apamin of *A. mellifera*; phospholipase A2 from *A. melífera*, but showed similarity with phospholipase A2 from *Nasonia vitripennis*. He also similarity with different allergens, neurotoxinas, metalloproteases, fenoloxidase and hialuronidase of different hymenopters. To examine the effect of peptides used if the test edematogênico noting that the immunized mice showed higher edematogênico level with 30 minutes and therefore faster than mice not immunized.

Key-works : *Phage Display*, venom, *Dinoponera australis*.

Introdução

Dentre os invertebrados encontra-se uma grande diversidade de animais que possuem aparatos de peçonha tão ou mais eficientes que alguns vertebrados (Meier, 1995). É o caso, de alguns artrópodes como aranhas e escorpiões e alguns insetos, particularmente aqueles que pertencem à ordem Hymenoptera (Barnes, 1996).

O veneno dos himenópteros é composto por moléculas orgânicas, como proteínas, peptídeos, lipídeos e aminas vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e algumas enzimas tais como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (Edstrom,1992; Lima e Brochetto-Braga, 2003). Essas substâncias são responsáveis pela toxicidade do veneno e vários destes componentes possuem propriedades farmacológicas e terapêuticas (Blum, 1978). As formigas utilizam seu veneno na defesa contra predadores, captura de presas e comunicação social (Schimdt, 1986).

Dinoponera representa um grupo notável e convergente da subfamília Ponerinae. As espécies de formiga do gênero *Dinoponera*, e outras espécies da subfamília Ponerinae pertencem a um grupo de formigas de interesse médico e biotecnologico (Haddad Junior et al., 2005).

Pouco se sabe sobre o veneno desta espécie, incluindo seus componentes. Novas estratégias para o estudo proteômico têm sido propostas e entre elas, a tecnologia de *Phage display* parece bastante promissora.

Phage display ou tecnologia de biblioteca de peptídeos apresentados em fagos tem sido uma importante ferramenta no mapeamento e identificação de epítopos de proteínas alvos com grande impacto na biologia celular, imunologia, produção de medicamentos e outros fármacos (Willats, 2002).

Phage display consiste em um método de seleção no qual uma biblioteca de peptídeos randômicos é expressa na superfície da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma viral (Azzazy e Highsmith, 2002). É utilizado, principalmente, bacteriófago M13 (Sidhu, 2001), um vírus bacteriófago filamentoso que parasita bactérias gram-negativas que por sua vez apresentam *pilus* F. O vírus utiliza a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. Este bacteriófago não

provoca lise na célula hospedeira, mas induz um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (Azzazy e Highsmith, 2002).

George Smith (1985) foi a demonstrar que fagos filamentosos poderiam ser utilizados para apresentar peptídeos antigênicos fundidos a uma proteína do capsídeo viral denominado de pIII. Esta metodologia foi inicialmente empregada para caracterização de epítopos de anticorpos monoclonais e policlonais, na qual fagos apresentando peptídeos poderiam então ser imunocapturados pelo respectivo antisoro dirigido contra o antígeno contendo os peptídeos presentes na superfície do capsídeo viral (Smith, 1985).

Essa metodologia pode ser utilizada para varrer a superfície de células, tecidos ou órgãos em busca de novos marcadores moleculares (Brown, 2000; Giordano et al., 2001). Em Hymenoptera, essa tecnologia tem sido usada, por exemplo, para identificar peptídeos ligantes a veneno de formiga, (Siquieroli, 2007); e peptídeos ligantes específicos de cérebro de abelha (Vieira, 2006). O presente trabalho teve como objetivo identificar peptídeos miméticos do veneno de *D. australis* por *Phage Display.*

Material e Métodos

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Material Biológico

Foram utilizadas formigas *Dinoponera australis* capturadas quando forrageavam nas proximidades de ninhos localizados no *Campus* Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG – S 18º 55'; W-GR 48º 17'). Foram capturas, em média, 10 formigas em cada coleta. Após a captura, os indivíduos foram levados ao laboratório para a extração do veneno. Após a retirada do veneno, as formigas eram devolvidas ao local de coleta.

Extração do veneno

Para extração do veneno, cada indivíduo foi imobilizado com pinça entomológica e sua gáster colocada em um tubo tipo *eppendorf*,. As formigas foram estimuladas manualmente a liberar o veneno no tubo e, em seguida, foi acrescentado tampão PBS (1X pH 7,5). O material foi conservado a -20℃. Para a quantificação de proteínas as amostras foram submetidas à dosagem segundo método de Bradford (Bradford 1976).

Obtenção de anticorpo Policlonal

Em coelhos Nova Zelândia, foram inoculado 400 µg de veneno bruto de *D. australis* com adjuvante completo Freund. Nas imunizações seguintes foi utilizado o adjuvante incompleto Freund para a obtenção de anticorpos policlonais. Realizaram-se quatro imunizações no total com intervalos de 15 dias. O soro foi analisado por meio de ELISA. Os anticorpos IgG produzidos contra o veneno bruto de *D. australis* foram purificados para analise.

Purificação dos anticorpos policlonais

Para a purificação dos anticorpos policlonais, colocou-se 45% do volume de final de sulfato de amônia no soro sanguíneo do coelho, que permaneceu 20h em agitação a 4º C. Em seguida, centrifugou a 4000rpm por 30 minutos. O sobrenadante passou a eluição em um sistema de ultrafiltração (AMICON 30), lavando várias vezes com água para a retirada do sal. A amostra concentrada foi liofilizada e armazenada a 4º C. A amostra foi ressupendida em 1 mL de tampão de eluição em pH neutro (Tris-HCl 0.1 M; NaCl 0.15 M ph 5.5) e colocado em uma coluna usando a resina roteína A sepharose, equilibrada com o mesmo tampão. Este tampão liga as IgG a coluna. Aplicou- se tampão acido 0.1 M glicina HCl pH3 para desligar as IgG da resina num pico assimétrico a alguns minutos após a troca de tampões. Cada fração foi monitorada a 280nm em espectrofotômetro É importante à rápida neutralização dos tubos com um álcali (1M Tris) para a proteção do estado nativo destas imunoglobulinas.

Seleção de fagos ligantes aos anticorpos

Para a seleção dos fagos foi utilizada uma placa de microtitulação (NUNC maxisorp [rt] Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, USA), onde um orifício foi sensibilizado com 10 µg de anticorpos policlonais (IgGs) produzidos contra o veneno de *D. australis* em tampão $NaHCO_3$ 0.1M pH 8.6. A placa foi agitada gentilmente em câmara úmida *overnight* a 4ºC e em seguida o excesso de proteínas foi descartado. Ao final da sensibilização, a placa foi bloqueada com tampão ($NaHCO_3$ 0.1M pH 8.6; 5mg/mL BSA) por 1h a 4ºC. Terminado o bloqueio a placa foi lavada por seis vezes em TBS 1X contendo 0.1% de Tween 20 (TBST) e incubada por 1h com 2 x 10^{10} partículas de fagos por poço, oriundos da biblioteca de peptídeos expressos em fagos M13 - *Ph.D.-12 Peptide 12-mer Phage Display Library* (complexidade: 2.7 x 10^9 transformantes) Peptide Library Kits (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA) - previamente diluídos em PBS

Os fagos não ligantes foram removidos lavando 10 vezes com TBST 0,1% no primeiro ciclo e 0.5% nos seguintes passos. Os fagos ligados foram eluidos com 0,1 µg de veneno bruto.

A concentração de Tween 20 foi aumentada (de 0.1% para 0.5%) para elevar a estringência do processo e para garantir a seleção de fagos altamente específicos.

Os fagos recuperados foram amplificados em *Escherichia coli* ER2738. A seleção foi repetida mais três vezes usando sempre o eluato anterior ao ciclo em questão como representante da biblioteca de fagos.

Titulação

A titulação é um procedimento necessário para determinar o número de partículas virais que foram incorporadas ao próximo passo da seleção.

A bactéria ER2738 foi crescida até OD_{600} ~ 0.5 em 10 mL de meio LB. Foram feitas alíquotas de 3 mL de Agarose Top (0.6 g de LB, 0.03 g de $MgCl_2$ e 0.21 g de agarose) em tubos Falcon mantidos em banho-maria a 60°C. Em seguida foram feitas diluição em serie 9:1 Feito a diluição, foram acrescentados 200 µL de meio com bactéria em cada tubo e incubado por 5 min. Foram adicionados 3 mL de Agarose Top em cada microtubo contendo a diluição, misturando rapidamente e vertendo em placa o meio LB sólido contendo IPTG/X-gal. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e o número de colônias azuis foi contado. O genoma do fago contém o gene da β-galactosidase e sua expressão é estimulada pelo IPTG. A enzima codificada por esse gene degrada o IPTG que, na presença do agente cromogênico X-gal, transforma os subprodutos em uma coloração azulada, indicando as colônias azuis que estão infectadas pelo vírus. Deste modo, 48 colônias de ER2738 infectadas com fagos foram selecionadas aleatoriamente com auxílio de palitos de madeira estéreis e acondicionadas em placas de 96 orifícios contendo 1 mL de meio LB/poço.

Extração de DNA de fago em placa *deepwell*

Os fagos foram amplificadosem placas *deepweel* (1 mL de meio LB por poço) por 24 h. A placa foi centrifugada por 20 min a 3.700 rpm. Foram pipetados 800mL da amostra para uma placa nova, na qual foi acrescentado 350 µL de PEG/NaCl. A mistura foi incubada por 20 min a 4°C. A placa foi novamente centrifugada por 40 mim a 3.700 rpm a 4ºC e em seguida invertida em papel absorvente. O *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, 1 mM EDTA, 4 M NaI). A placa foi agitada vigorosamente e depois foram adicionados 250 µL de etanol 100%. O material foi incubado por 10 min a temperatura ambiente para precipitar o DNA. A placa foi centrifugada por 40min a 20ºC por 3.700 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 150 µL de etanol 70%, seguido de uma rápida centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspendido em 20 µL de H_2O MiliQ. A qualidade e quantidade do DNA viral foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Seqüenciamento

Na reação de seqüenciamento foram utilizados 400 ng de DNA molde, 5 pmol do *primer* -96 gIII (5'-^{OH} CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. –Amersham Biosciences). A reação de 30 ciclos foi realizada em Termociclador de Placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (95ºC por 20seg); anelamento do *primer* (50ºC por 15seg) e extensão (60ºC por 1min). O DNA seqüenciado foi precipitado com 1 µL de acetato de amônio e etanol, homogeneizando a placa com leves batidas. Então foram acrescentados 27.5 µL de etanol absoluto e em seguida, a placa foi centrifugada por 45 min a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150 µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 10 min a 4000 rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nessa posição foi pulsada a 800 rpm. A placa foi coberta com papel alumínio, permanecendo por 5 min para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram

ressuspendidos no Tampão de Diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. –Amersham Bioscieces).

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático MegaBace (Amersham Biosciences).

Bioinformática

Após seqüenciamento, as seqüências de DNA foram traduzidas pelo programa DNA2PRO. Este programa é designado para tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs (Ph.D.-12™ or Ph.D.-7™*) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor, no caso o bacteriófago M13. O programa, automaticamente, localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na seqüência (tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima (http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx).

A análise de similaridade dos peptídeos com proteínas do veneno de insetos foi feita utilizando-se o banco BLASTp (NCBI: http://www.ncbi.nlm.nig.gov/blast).

O programa MATCH foi utilizado para alinhamento de proteínas de veneno de insetos depositados em bancos de dados com os peptídeos encontrados (https://relic.bio.anl.gov/match.aspx).

Amplificação de fagos

Os fagos selecionados foram amplificados seguindo a metodologia descrita a seguir. Inoculou-se uma colônia de ER2738 em 20mL de meio LB, incubada sob agitação a 37°C por 16h. Esta foi diluída em meio LB (autoclavado e com tetraciclina-1µL/1mL) em um volume final de 200 mL para cada fago.

Em tubo tipo *falcon* por 12h em agitação a 37°C. Centrifugou-se os tubos por 20 min a 3700 rpm, transferindo seu conteúdo para outro *falcon* estéril, por pipetagem, coletando o máximo de sobrenadante possível. Adicionou-se 1/6 do volume em PEG/NaCl incubando-a por mais 2 h a 4°C. Centrifugou-se por 20min a 3700 rpm. Verteu-se a *falcon* dispensando todo o sobrenadante, e ressuspendeu-se o precipitado em 200 µL de PBS 1X.

Detecção de Atividade Enzimática

O teste enzimático foi realizado utilizando os substratos do Kit Api Zym (Bio Mèrieux), o qual identifica semiquantitativamente 19 diferentes enzimas. O Kit consiste em um painel com 20 micro-poços, cada um contento um substrato específico para cada enzima a ser testada. O veneno bruto diluido em PBS foi distribuído nos micropoços. Incubou se o material por 4h a 37º C. Após o tempo de incubação acresentou-se uma 1 gota do reagente ZYM A e 1 gota do reagente ZYM B. o painel foi esposto a luz do sol por 30 minutos, fez se, então a anotação da cor adquirida em cada micropoço e comparou com a tabela fornecida pelo fabricante. O resultado, portanto, da reação enzima-substrato é um produto colorido, variando a cor de acordo com a enzima testada. . A intensidade da cor é diretamente proporcional à hidrólise do substrato, sendo anotadas de 0 a 5. A nota 0 corresponde a uma reação negativa, a nota 5 a uma reação de intensidade máxima e nas reações intermediárias são consideradas positivas as notas acima de 3.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Uma placa de alta afinidade (Costar-Corning 3590, NY, USA) foi sensibilizada com IgG (1ug/poço),em Tampão Bicarbonato 0,006M pH 9,6, durante 16 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas durante 1 hora, utilizando leite desnatado 5% (Molico). As placas foram lavadas por 3 X com PBST e incubadas por 1 hora a 37°C com 1x 10^{11} dos fagos selecionados por poço e do fago *helper* (fago que não expressa a proteína exógena). Posteriormente, as placas foram lavadas em PBST (6x) e incubadas por 1 horas a 37°C com anti-M13 (SIGMA) conjugado com peroxidase, diluído em Tampão de Bloqueio na concentração de 1:5000. Ao final da incubação, as placas foram novamente lavadas por 6X em PBST e a reação ocorreu pela adição de Tampão Citrato-Fosfato 0,1 M pH 5.0 suplementado com H_2O_2 0.03% e orto-fenilenodiamina (OPD) a 1 mg.mL-1. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N e a OD obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm. Foi calculado o valor *cut off* para cada

amostra, segundo a fórmula: *cut off* = média *Helper* + 2X desvio padrão. O índice ELISA foi calculado considerando-se OD/ *cut off.* Valores acima de 1 foram considerados positivos.

Imunização de camundongos

Foi feita a imunização de camundongos da linhagem swiss cedidos pela Vale S/A, Uberlândia, MG. Para a imunização, 4 grupos de 5 camundongos foram separados em baias. O grupo 1 não foi imunizado, os grupos 2, 3 e 4 foram imunizados com veneno bruto, fago selvagem e fagos selecionados (mistura dos fagos D1,D2,D4,D10), respectivamente. A imunização ocorreu de 15 em 15 dias, utilizando adjuvante completo Freund para a primeira imunização, e adjuvante incompleto Freund, nas imunizações seguintes. Ao fim da imunização fez-se o teste do edema.

Teste de Edema

Foi feito o teste de edema nos 3 grupos de camundongos imunizados e no grupo não imunizado. O veneno foi injetado, subcutâneamente na região plantar da pata direita, na quantidade de 10 µg de proteína de veneno. O edema foi medido em diferentes intervalos de tempo (0'; 30'; 60'; 120'e 180') com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess).

Análise estatística

Utilizou-se o teste estatístico de Kruskal - Wallis para análise de dados não paramétricos (BioEstat 3.0)

Resultados e Discussão

Biopanning – Seleção de peptídeos

Após a imunização, as imunoglobulinas G foram purificadas e usadas para a seleção dos peptídeos. As titulações realizadas foram eficientes em todos os ciclos de seleção de peptídeos. No final de cada ciclo de seleção o eluato e o amplificado foram titulados (Tabela 1). Os títulos de entrada dos fagos no *biopannig* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos policlonais (IgG) ficam ligados a este pela interação peptídeo/IgG, e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade são lavados (removidos). Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

Tabela 1: Seleção dos fagos com peptídeos do veneno de *D. australis*. Título obtido (pfu) no processo de seleção.

Ciclos	Número de partículas de fagos	
	Eluato	Amplificado
1º Ciclo de seleção	$1,1x10^4$	$6,9x10^9$
2º Ciclo de seleção	$2,1x10^4$	$1,0x10^{12}$
3º Ciclo de seleção	$2,2x10^5$	$3,6x10^{12}$
4º Ciclo de seleção	$4,2x10^6$	

Todas as colônias de bactéria nas titulações apresentaram a coloração azul, indicando quebra do substrato IPTG corado pelo X-Gal, e mostrando a expressão do gene da β-galactosidase .

Seqüenciamento de DNA e Bioinformática

Após o quarto ciclo foram escolhidas aleatoriamente 48 colônias para a análise. Essas foram amplificadas e o DNA dos fagos foram extraídos e sua

qualidade analisadas, mostrando ausência de degradação e de contaminantes, podendo ser, então, seqüenciados. Os cromatogramas gerados pelo seqüenciador foram analisados pelo programa PHRED BASECALLING.

Utilizou-se o programa DNA2PRO para traduzir as seqüências. Este programa forneceu 26 peptídeos, dos quais foram identificadas 16 seqüências diferentes (Tabela 2) dentre essas seqüências houve repetição apenas o peptídeo *kphahelhrhtr*.

Tabela 2: Seqüência dos peptídeos identificados pelo programa DNA2PRO, e a freqüência observada de cada peptídeo.

.

clones	**Peptideo**	Freqüência observada	Porcetagem
D1	krdktslstlak	1/26	3,84%
D2	kphahelhrhtr	11/26	42,30%
D3	hywqtwtypfst	1/26	3,84%
D4	ssmppiselsqa	1/26	3,84%
D5	fvaayfqavswg	1/26	3,84%
D6	thsnatgqltvr	1/26	3,84%
D7	gysdflpgesrp	1/26	3,84%
D8	hpsptlfrhdtx	1/26	3,84%
D9	nerleilqrfss	1/26	3,84%
D10	dystlpaiselt	1/26	3,84%
D11	fplhshmhrhsh	1/26	3,84%
D12	lphisemrmkih	1/26	3,84%
D13	xildwrysisax	1/26	3,84%
D14	niwhlrsdxqvy	1/26	3,84%
D15	flppiseqfswg	1/26	3,84%
D16	kphahelhlaya	1/26	3,84%

Buscou se similaridade dos peptídeos analisados contra seqüências de peptídeos de veneno de insetos depositados em bancos de dados (GeneBank) (Tabela 3). Observou-se que 7 dos peptídeos apresentam similaridade com ADAM metaloprotease de *Culex quinquefasciatus* e 15 peptídeos com similaridade com uma proteína similar a fosfatase ácida de veneno encontrada em *Nasonia vitripennis*.

Tabela 3: Análise de bioinformática dos peptídeos selecionados por *Phage Display* em veneno de *D. australis* contra proteínas de veneno de insetos.

Clones	Peptídeos	Numero de acesso	Prováveis alvos proteicos	Espécie
D1	krdktslstlak	gb|AAB48072.1| emb|CAC04149.1| ref|XP_001607714.1| ref|XP_001862944.1|	• allergen and phospholipase A1 • phenoloxidase II • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase • ADAM metalloprotease	• *Vespula vulgaris* • *Pimpla hypochondriaca* • *Nasonia vitripennis* • *Culex quinquefasciatus*
D2	kphahelhrhtr	emb|CAC04150.1| ref|XP_001862944.1| ref|XP_001605498.1|	• phenoloxidase I • ADAM metalloprotease • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Pimpla hypochondriaca* • *Culex quinquefasciatus* • *Nasonia vitripennis*
D3	hywqtwtypfst	emb|CAD21587.1| ref|NP_001119715.1| ref|XP_001604543.1| ref|XP_001862944.1|	• putative venom metalloprotease • venom dipeptidylpeptidase IV • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase • ADAM metalloprotease	• *Pimpla hypochondriaca* • *Apis mellifera* • *Nasonia vitripennis* • *Culex quinquefasciatus*
D4	ssmppiselsqa	gb|ACC93935.1| ref|XP_001862944.1| ref|XP_001600770.1|	• venom antigen 5 • ADAM metalloprotease • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Rhynchium brunneum* • *Culex quinquefasciatus* • *Nasonia vitripennis*
D5	fvaayfqavswg	gb|AAP49428.1| sp|P81657|VA5_VESMA	• venom protein Vn50 • Venom allergen 5	• *Cotesia rubecula* • *Vespa mandarinia*

		ref|XP_001604767.1| ref|XP_001862944.1|	• PREDICTED: similar to venom acid phosphatase • ADAM metalloprotease	• *Nasonia vitripennis* • *Culex quinquefasciatus*
D6	thsnatgqltvr	ef|XP_001862944.1| ref|XP_001607714.1| ref|NP_001011619.1|	• ADAM metalloprotease • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase • hyaluronidase	• *Culex quinquefasciatus* • *Nasonia vitripennis* • *Apis mellifera*
D7	gysdflpgesrp	ref|XP_001844171.1| ref|XP_001606910.1|	• secretory Phospholipase A2 • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Culex quinquefasciatus* • *Nasonia vitripennis*
D8	hpsptlfrhdtx	ref|XP_001865176.1| ref|XP_001604543.1|	• venom allergen 5 • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Culex quinquefasciatus* • *Nasonia vitripennis*
D9	nerleilqrfss	sp|P49371.1|HUGA_DOLMA sp|P35781|VA51_VESCR ref|XP_001862944.1| ref|XP_001605515.1|	• Hyaluronoglucosaminidase • Venom allergen 5. • ADAM metalloprotease • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Dolichovespula maculata* • *Vespa crabro* • *Culex quinquefasciatus* • *Nasonia vitripennis*
D10	dystlpaiselt	gb|ABF21078.1| ref|XP_001845617.1| ref|XP_001605977.1|	• icarapin variant 2 precursor • venom allergen 5 • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Apis mellifera* • *Culex quinquefasciatus* • *Nasonia vitripennis*
D11	fplhshmhrhsh	ref|XP_001604496.1| sp|Q06478|PA11_DOLMA	• PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Nasonia vitripennis* • *Dolichovespula maculata*

			• Phospholipase A1 1 precursor	
D12	lphisemrmkih	emb|CAL59818.1| ref|XP_001604543.1|	• hyaluronidase • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Vespula germanica* • *Nasonia vitripennis*
D13	xildwrysisax	ref|NP_001119715.1| ref|XP_001604473.1|	• venom dipeptidylpeptidase IV • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Apis mellifera* • *Nasonia vitripennis*
D14	niwhlrsdxqvy	ref|NP_001119716.1| gb|AAY57281.1|	• venom carboxylesterase-6 • venom allergen acid phosphatase	• *Apis mellifera* • *Apis mellifera*
D15	flppiseqfswg	gb|ABY19393.1| ref|XP_001604543.1|	• venom protein 6 • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Microctonus hyperodae* • *Nasonia vitripennis*
D16	kphahelhlaya	gb|ACA00159.1| ref|XP_001607714.1|	• dipeptidylpeptidase IV preproprotein • PREDICTED: similar to venom acid phosphatase	• *Vespula vulgaris* • *Nasonia vitripennis*

Devido a isso, fez se o alinhamento entre a estrutura primária da ADAM metaloprotease e da fosfatase ácida com os peptídeos obtidos, utilizando o programa MATCH. As Figuras 1 e 2 mostra a região de maior similaridade entre a ADAM metaloprotease e da fosfatase ácida com os peptídeos analisados, respectivamente.

```
↓ Maximum similarity position= 151

egsnathdpelhresefqrlsrhkratakssspirgpynankhssyvelvividnkmfk
    kphahelhrhtr
thsnatgqltvr
    fplhshmhrhsh
```

Figura 1: Região de maior similaridade entre os peptídeos selecionados por *phage display* através do programa match e ADAM metaloprotease de *Culex quinquefasciatus.*

ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) são uma família de proteínas da superfície celular que combinam características de moléculas de adesão e de proteases (Wolfsberg et al., 1995), membros da superfamília das proteases dependentes de zinco e da subfamília das metzincinas. Possui em sua estrutura domínios desintegrinas e metaloprotease.

Segundo Seals e Courtneidge (2003) foram identificados 19 genes que codificam para ADAMs, sendo que mais de 30 membros protéicos desta família já foram descritos (Primakoff e Mylles, 2000). Essas proteínas têm sido implicadas em processos biológicos, tais como modulação da migração celular (Alfandari et al., 2001) ativação de vias de sinalização pela liberação de citocinas e fatores de crescimento ligados a membrana (Black et al., 1997), como por exemplo a ADAM-17 está envolvida na liberação de TNFα (fato de necrose tumoral) da membrana celular (Black et al., 1997). Estão relacionadas, também, a múltiplos processos de desenvolvimento e estão envolvidos no desenvolvimento de algumas doenças como diabetes, mal de Alzheimer (Seals e Courtneidge 2003).

Cerca de metade das ADAMs possui alterações nas suas seqüência relacionadas ao zinco, o que resulta na ausência de atividade proteolítica (Black e White, 1998)

Poucas ADAM metaloprotease têm sido descritas em insetos, sendo que a mais estudada é a ADAM 10 de *Drosophila.* (Rooke et al., 1996). A ADAM Tem papel importante durante a neurogênese em Drosophila e parece estar envolvida também no processo de orientação do axônio (Fambrough et al., 1996 Hattori et al., 2000)

```
↓ Maximum similarity position= 158
gdfldyvrdktqiiserlvpismiaselqcvrslglplpdwcsekdfkrl
      krdktslstlak
         flppiseqfswg
                flppiseqfswg
```

Figura 2: Região de maior similaridade entre os peptídeos selecionados por phage display através do programa match e fosfatase ácida de *Nasonia vitripennis.*

Fosfatases são enzimas amplamente distribuídas, *in natura,* em organismos procariotos e eucariotos (McComb et al.,1979; Gonzalez et al., 1994; Lawton et al., 1994; Tuleva et al., 1998; Guimarães et al., 2003). Essas enzimas são classificadas de acordo com seu pH ótimo. Elas são capazes de hidrolizar uma ampla variedade de ésters e acido fosfórico anidrido liberando fosfato (Guimarães et al., 2001), e elas estão envolvidas em muitos processos biológicos tais como transdução de sinal (Kostrewa et al., 1999).

Fosfatase ácida é um das maiores enzimas lisossomais de invertebrados (Anderson, 1981), e em geral está associada com degradação e morte celular (Bowen and Lockshin, 1981 and). Ela pode ser encontrada também em secreções celulares, (Carneiro et al. 2001). Dani e colaboradores (2005) sugerem que a fosfatase ácida encontrada no veneno de *Pimpla hypochondriaca* foi obtida

a partir de células do epitélio da glândula de veneno, e excretada juntamente com outros componentes do veneno.

Para confirmar a presença da fosfatase ácida, mapeada por *phage display* sua atividade no veneno de *D. australis* foi investigada, usando o kit Api Zym (Bio Mèrieux). Este kit identifica semiquantitativamente 19 diferentes enzimas presentes em extratos não purificados. Das 19 enzimas analisadas, apenas 3 estiveram presentes no veneno de *D. australis*: fosfatase alcalina, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação da atividade enzimática do veneno de *D. australis* pelo kit Api-Zym (Bio Mèrieux). Os valores de 0 a 5 representam as notas aplicadas a cada reação, conforme carta de cores do fabricante. Notas acima de 3 indica reatividade.

Enzimas	Notas Aplicadas*
Fosfatase alcalina	3
Esterase (C4)	2
Esterase Lipase (C8)	1
Lipase (C14)	0
Leucina arilamidase	0
Valina arilamidase	0
Cistina arilamidase	0
Tripsina	0
α-quimotripsina	0
Fosfatase ácida	5
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	5
α-galactosidase	0
β-galactosidase	2
β-glicorunosidase	0
α-glicosidase	1
β-glicosidase	1
N-acetil-β-Glicosaminidase	2
α-manosidase	0
α-fucosidase	0

*** 0 = sem atividade enzimática; os de valores 1 a 5 correspondem a 5, 10, 20, 30 e 40 nanomoles de substrato hidrolizado, respectivamente.**

Os resultados mostram uma alta atividade de fosfatase ácida mostrando a eficiência da técnica *phage display* no mapeamento de proteínas do veneno de *D australis.*

Há poucos artigos referentes à fosfatase ácida em venenos. Em insetos está relatada principalmente em *Apis mellifera* e alguns endoparasitas como *Pimpla hypochondriaca* (Dani et al., 2005) *Pteromalus puparum* (Zhu, et al.2008).

Análises ultracitoquimicas revelaram alta atividade enzimática localizadas no núcleos e vesículas secretoras de células secretoras da glândula de veneno de *Pteromalus puparum* (Zhu, et al.2008).

A fosfatase ácida (Api m 3) é um dos componentes do veneno de *Apis melífera*, responsáveis pela reação alérgica (Grunwald et al 2006).

O veneno de himenopteras contém proteínas alergênicas, assim como componentes não alergênicos incluindo toxinas, aminas vasoativos, acetilcolina e cinesinas (Hoffman, 2004). Entre os múltiplos alérgenos encontrados nos himenópteras, o maior alérgeno de veneno de abelha é a fosfolipase A2 (apim1 e de vespas é antígeno 5 (ves v 5) (Golden, 2005)

Para o mapeamento dos componentes do veneno de *D. australis*, utilizou-se do programa MATCH (https://relic.bio.anl.gov/match.aspx). Diferentes proteínas conhecidas de veneno de outros himenópteras (*Apis, Pimpla, Nasonia*) que continham suas seqüências protéicas depositadas no Genebank foram utilizadas para essa analise (Tabela 5). As proteínas analisadas foram: melitina, profenoloxidase, hialuronidase, fosfolipase, alergenos, metaloprotease, inibidor de serino protease, neurotoxinas.

Tabela 5 : Mapeamento dos componentes do veneno de *D. australis* utilizando o programa MATCH

Proteínas	espécie	Apresentou Match
apamin	*Apis mellifera*	não
fenoloxidade	*Pimpla hypochondriaca*	sim
hyaluronidase	*Vespula germanica*	sim
hyaluronidase	*Nasonia vitripennis*	sim
icarapin	*Apis mellifera*	sim
Maior alergeno	*Mymercia pilosula*	não
MCP peptide	*Apis mellifera*	não
Melittin	*Vespa magnifica*	não
melittin	*Apis mellifera*	não
metalloprotease	*Apis mellifera*	sim
metalloprotease	*Nasonia vitripennis*	sim
Neu 3	*Apis mellifera*	sim
neurotoxin	*Nasonia vitripennis*	sim
PLA2	*Nasonia vitripennis*	sim
PLA2	*Apis mellifera*	não
similar a sphingomyelin phosphodiesterase	*Nasonia vitripennis*	sim
similar ao Serine protease inhibitor 5	*Apis mellifera*	sim
sol1 PLA2	*Solenopis invicta*	sim
veneno protease	*Apis mellifera*	sim
venom carboxylesterase 6	*Apis mellifera*	sim
vn50	*Nasonia vitripennis*	sim

Os peptídeos não apresentaram similaridade com: melitina de *Apis mellifera* e *Vespa magnífica*; maior alérgeno de *Myrmecia pilosula;* Apamin de *A. melífera*; fosfolipase A2 de *A. mellifera*, mas apresentou similaridade com fosfolipase A2 de *Nasonia vitripennis*. Apresentou, também, similaridade com diferentes alergenos, neurotoxinas, metaloproteases, fenoloxidase, hialuronidase (Figura 3)

Figura 3: Mapeamento de epítopos de proteínas de veneno de himenópteras utilizando os peptídeos selecionados por *phage display* através do programa match. A - hialuronidase de *Nasonia vitripennis,* B- fenoloxidase de *Pimpla hypochondriaca* C – Fosfolipase de *Nasonia vitripennis.*

Análise por ensaios de ELISA permitiu uma quantitativa da imunoreatividade dos fagos mimetopos selecionados. Foram considerados reativos os clones com valores acima de 1. Com exceção do clone D9, todos demais foram imunoreativos (Figura 4)

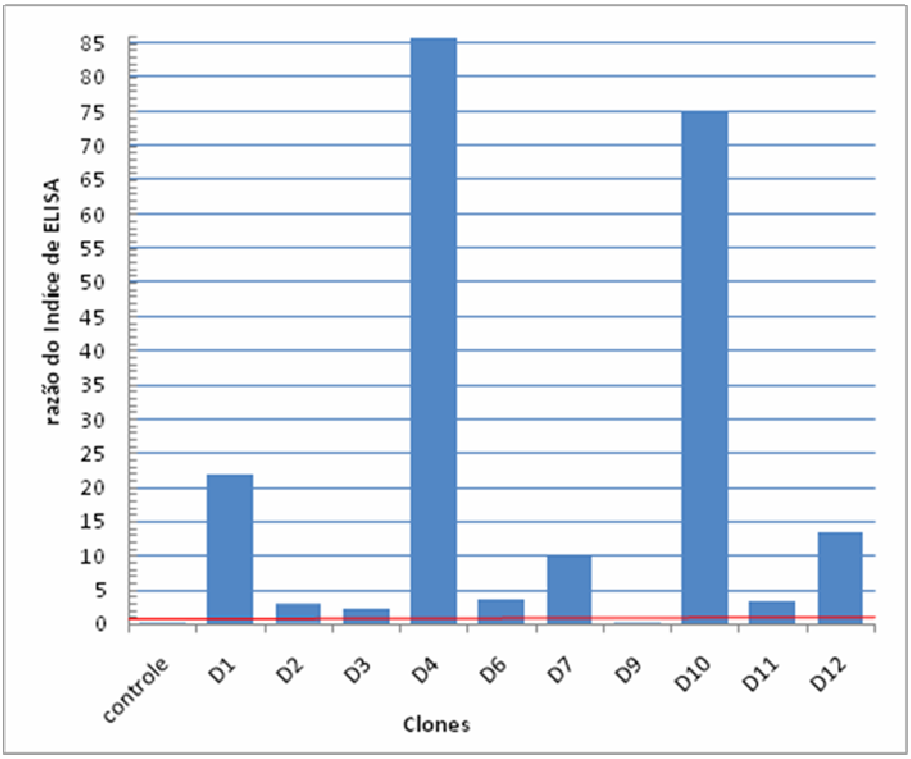

Figura 4: Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio ELISA mostrando a reatividade dos clones analisados.

Os clones D1, D3 e D10 foram os clones mais reativos por isso foram escolhidos para serem utilizados na imunização de camundongos. O clone D2, também foi usado na imunização por ser o que apresentou maior freqüência. (tabela 2)

Após as imunizações foi feito o teste de edema, por ser o único teste *in vivo* padronizado para o veneno de *D. australis.* Sabe-se que o pico de ação do veneno de *D. australis* ocorre aos 60 minutos (Cologna, 2005).

Comparando os tempos de tratamentos o edema foi induzido de forma significativa nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos ($p<0,05$), em todos os grupos. Entre os tratamentos (fago selvagem, veneno bruto, fagos mimetopos) não houve diferença significativa. Entretanto, houve uma diminuição significativa do edema entre os tratamentos e o controle ($p<0,05$) (Figura 5).

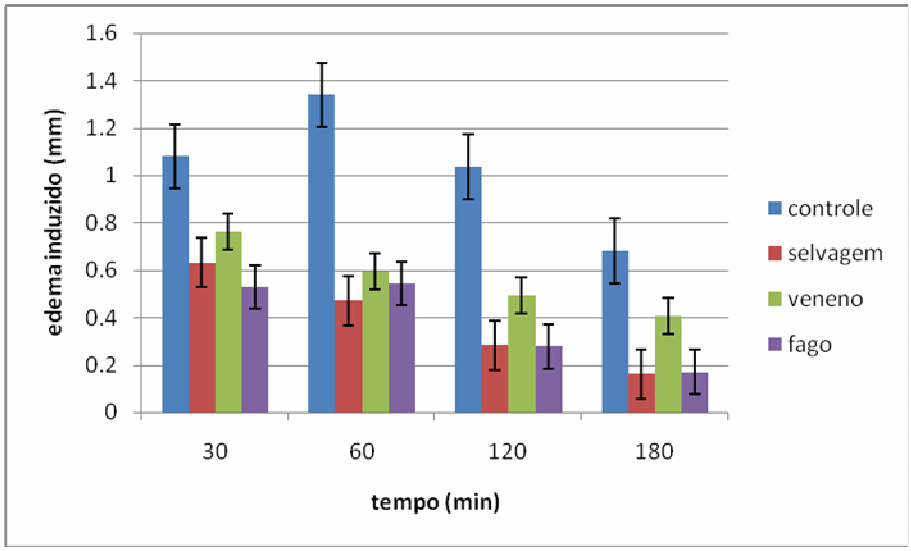

Figura 5: Médias dos edemas induzidos em patas de camundongos imunizados nos diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Nos camundongos imunizados (selvagem, veneno bruto, fago mimetopo) o pico ocorreu com 30 minutos, diferente do controle onde o pico ocorre em 60 minutos. Essas diferenças entre os picos e diminuição significativa do edema nos grupos tratados deve ser, provavelmente, por estarem sensibilizados a algum componente da imunização, como o adjuvante, e não devido a resposta imune gerada contra o veneno ou mimetopo, visto que não houve diferença significativa entre os grupos imunizados com o veneno bruto, fago mimetopo e o controle fago selvagem.

O teste de edema não foi eficiente para analisar o efeito de fagos mimetopos na resposta imune humoral. Entretanto, foi confirmada a presença e atividade da fosfatase ácida no veneno, utilizando o Kit Api Zym. Essa proteína foi uma das identificadas e mapeadas por *phage display*, demonstrando que essa técnica foi eficiente no mapeamento de epítopos do veneno de *D. australis*.

Referência Bibliográfica

Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Smith, K., White, J.M., Darribere, T., Desimore, D.W., 2001. Xenopus ADAM-13 is a metalloprotease required for cranial neural crest cell migration. Curr.biol. 11,918-930.

Anderson, R.S. 1981. Comparative aspects of the structure and function of invertebrate leucocytes. In: N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley, Editors, *Invertebrate Blood Cells* vol. II, Academic Press, New York pp. 630–632.

Azzazy, HM., Highsmith Jr., WE., 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clin. Biochem. 35, 425-445.

Barnes, R.D., Ruppert, E.E., 1996. Zoologia dos Invertebrados. Editora Roca. São Paulo, 1029 p.

Black, R.A., Rauch, T.C., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F.,Castner, B.J.,Stocking, K.L., Reddy, P.,Srinivasan, S.,Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., cerretti, D.P., 1997. A metalloproteinase disintefrin that releases tumor-necrosis factor-α from cells. Natura 385,729-732.

Black, R.A. White, J.M., 1998. ADAms:focus on the protease domain Curr Opin Cell Biol 10, 654-659.

Blum, M.S., 1978. Biochemical defenses of insects. In: M. Rockstein (ed). Biochemistry of insects. Academic Press. London, pp. 465-513.

Bowen D., Lockshin R.A., 1981. *Cell Death in Biology and Pathology*, Chapman and Hall, New York pp. 379–444.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brown, K.C., 2000. New approaches for cell-specific targenting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries.Curr Opin Chem Biol. 4(1),16-21

Carneiro, S.M., Fernandes, W., Della Casa, M.S., Sesso, A., 2001.Cytochemical analysis of acid phosphatase activity in the venom secretory cells of *Bothrops jararaca*, Tissue Cell 33, 311–317.

Cologna, C. A. 2005. Estudos bioquímicos e biólogicos da peçonha *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) Monografia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Dani, M.P., Edwards, E.P., Richards, E.H., 2005. Hydrolase activity in the venom of the pupal endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca* Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 141(3),373-381.

Edstrom, A., 1992. Venomous and poisonous animals. Krieger Publishing Company. Malabar. 210p.

Fambrough, D., pan, D., Rubin, F.M., Goodman, C.S., 1996. The cell surface metaloprotease/desintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in Drosophila. Proc.Natl.Acad.Sci.Usa 93,13233-13238.

Fundenberg HH., Stites DP., Caaldwell JLl., Wells JV. Basic Clinical Immunology. Los Altos: Lange Med, 1980. 380p

Giordano, R.J., Cardo-Vila, M., Lahdenranta , J., Pasqualini, R., Arap, W., 2001. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. Nat Med 7911), 1249-1253.

Golden, D. B. K., 2005. Insect sting allergy and venom immunotherapy: A model and a mystery Current reviews of allergy and clinical immunology 115(3), 439 - 447

Gonzalez, F., Farezvidal, M.E., Arias, J.M., Montoya, E., 1994. Partial-purification and biochemical-properties of acid and alkaline-phosphatases from Myxococcus–Coralloides-D. J. Appl. Bacteriol. 77, 567–573.

Gregorc, A., Bowen, I.D., Pogacnik, A., 1998. Acid phosphatase activity in the midgut of honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae, Apidologie 29, 579–584.

Grunwald, T., Bockisch, B., Spillner, E., Ring, J., Bredehorst, R., Ollert, M.W., 2006. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3) J Allergy Clin Immunol. 117(4), 848-854.

Guimaraes, L.H.S., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Jamur, M.C., Oliver, C., Polizeli, M.D.T.D., 2003. Effect of carbon source on alkaline phosphatase production and excretion in *Aspergillus caespitosus*. J. Basic Microbiol. 43, 210–217.

Guimaraes, L.H.S., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Polizeli, M.L.T.M., 2001. Thermostable conidial and mycelial alkaline phosphatases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27, 265–270.

Haddad Junior, V., Cardoso, JLC., Moraes, RHP., 2005. Description of an injury in a human caused by a false tocandira (*Dinoponera gigantean*, Perty, 1833) with a revision on folkloric, pharmacological and clinical aspects of the giants ants of the genera *Paraponera* and *Dinoponera* (sub-family Ponerinae). Rev. Inst. Med. Trop. 47, 235-238.

Hattori, M., Osterfield, M., Flanagan, J.G., 1996. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. Science 289,1360-1365.

Hoffman D.R., 1996. Hymenoptera venom proteins. Nat. Toxins, , 2, 169-86.

Hoffman, D.R., 2004. Hymenoptera venoms: composition, standardization, stability. In: Levine MI, Lockey RF, editors. Monograph on insect allergy. 4th ed. Milwaukee (WI): American Academy of Allergy Asthma and Immunology; p. 37-53.

Kostrewa, D., Wyss, M., D'Arcy, A., van Loon, A.P.G.M., 1999. Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 angstrom resolution. J. Mol. Biol. 288, 965–974.

Lawton, P., Sarciron, E., Petavy, A.F., 1994. Purification and characterization of the alkaline-phosphatase from *Echinococcus granulosus* cyst membranes. J. Parasitol. 80, 667–673.

Leluk, J., Schmidt,J., Jones D., 1989. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoir. Toxicon. 27(1), 105-114.

Lima, P.R.M., Brochetto-Braga, MR., 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera.* Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 9 (2), 149-162.

Mariano, · C. S. F., Delabie ,· J. H.C., Ramos. L. S., Lacau, S., · Pompolo, S. G., 2004. *Dinoponera lucida* Emery (Formicidae: Ponerinae): the highest number of chromosomes known in Hymenoptera. Naturwissenschaften 91,182–185

McComb, R.B., Bowers Jr., G.N., Posen, S., 1979. Alkaline Phosphatases. Plenum Press, New York.

Meier, J., 1995. Venomous and Poisonous Animals – A Biologist's View. In: Meier, J., White, J., (eds). Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press. London, pp. 1-8.

Primakoff, P., Myles, D.G., 2000. The ADAM gene family-surface proteins with adhesion and protease activity Trens Genetic 16, 82-87

Rooke, J., Pan,D., Xu,T., Rubin, G.M., 1996. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila neurogenesis*, Science 273, 1227–1231.

Schmidt, J.O., 1986. Biochemical, Pharmacological and Behavioral Aspects of ant venoms In: Piek, T., (ed.). Venoms of the Hymenoptera. Academic Press, New York, pp. 425-508.

Seeals, D.F., Courtneidge, A.S., 2003. The ADAMs family of metallproteases; miltidomain proteins with multiple functions. Gen Dev 17, 7-20

Sidhu, SS., 2001. Engineering M13 for phage display. Biomol. Eng. 18, 57-63.

Siquieroli, A.C.S., 2007. Identificação de peptídeos ligantes ao veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) por *phage display* Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.

Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 228, 1315-7.

Tuleva, B., Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., 1998. A specific alkaline phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* with protein phosphatase activity. FEMS Microbiol. Lett. 161, 139–144.

Vieira, CU., 2006. Expressão de genes das vias de biossíntese e degradação do hormônio juvenil e caracterização de peptídeos ligantes ao cérebro de *Melipona*

scutellaris (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.

Willats, W.G., 2002. Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol Biol. 50, 837-54.

Wolfsberg, T.G.; Primakoff, P., Myles, D.G., White, J.M., 1995. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A DisintegrinAnd Metalloprotease domain:multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. J Cell Biol 13, 275-278.

Zhu, J., Ye, G., Hu, C., 2008. Molecular cloning and characterization of acid phosphatase in venom of the endoparasitoid wasp Pteromalus puparum (Hymenoptera: Pteromalidae). Toxicon 15, 1391-1399

Capitulo 3:

EFEITOS DO VENENO DE *Dinoponera australis* (HYMENOPTERA,FORMICIDAE, PONERINAE) NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS SANGUINEAS, *IN VITRO*

Resumo

A análise dos componentes do veneno de himenópteras é uma fonte rica de informação sobre as funções e mecanismos biológicos desse veneno. É importante, também, por desencadear reações alérgicas em humanos e por apresentar aplicações terapêuticas. As citocinas são um grupo heterogêneo de mediadores celulares peptídicos associados à ativação do sistema imune e às respostas inflamatórias. Os receptores *Toll-like* (TLRs) são proteínas transmembranas caracterizadas por seqüências extracelulares repetidas ricas em leucina, capazes de reconhecer um amplo grupo de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) de diferentes espécies de microrganismos e fundamentais para a ativação da resposta imune inata. Este trabalho analisou o perfil de resposta imunológica em células sanguíneas, *in vitro,* estimulado por veneno de *Dinoponera australis* em diferentes concentrações (0.5; 1;e 3 ug) e analisou, também, o efeito das mesmas concentrações de veneno bruto na expressão do mRNA do gene TLR4 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) por PCR Tempo Real. Sangue humano foi obtido de doadores voluntários, coletados em tubos contendo heparina. As citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura de sangue periférico foram dosadas por ELISA utilizando pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis. O veneno bruto em todas as concentrações analisadas estimulou significativamente a produção de IL-10 em cultura de sangue total e diminuição de TNF-α. A IL-10 tem uma alta atividade anti-inflamatória tanto nas funções de linfócitos como de monócitos. Esta citocina diminui a produção de uma série de citocinas pró-inflamatorias como IL1, TNF-α e IL6. Os níveis de expressão gênica do TRL4 foram determinados por PCR tempo-real e normalizados com os níveis de expressão do gene constitutivo HPRT. Houve uma diminuição significativa na expressão do mRNA do gene TLR4 em cultura de PBMC humano somente na concentração de 3µg. Esses dados sugerem que algum componente do veneno bruto dessa formiga tem efeito modulador na expressão de TLR4 e potente efeito antiinflamatório.

Palavras-chave: veneno, TLR4, citocinas

Abstract

The analysis of the components of the venom of himenopteras is a rich source of information on the functions and mechanisms of biological poison. It is important, also, for trigger allergic reactions in humans and to present therapeutic applications. The cytokines are a heterogeneous group of mediators cellular peptídicos associated with activation of the immune system and inflammatory responses. The Toll-like receptors (TLRs) are proteins transmembranas characterized by repeated sequences extracellular leucine-rich, capable of recognizing a broad group of pathogens associated with the molecular patterns (PAMPs) of different species of microorganisms and essential for the activation of the innate immune response. This study examined the profile of immune response in blood cells in vitro, stimulated by venom of *Dinoponera australis* in different concentrations (0.5, 1 and 3 mg) and examined, also, the effect of the same concentrations of poisonous raw in the expression of mRNA the gene TLR4 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by Real Time PCR. Human blood was obtained from volunteer donors, collected in tubes containing heparin. The cytokines in culture supernatants of peripheral blood were measured by ELISA using pairs of monoclonal antibodies commercially available. The venom at all concentrations tested significantly stimulated the production of IL-10 in culture of whole blood and reduction of TNF-α. The IL-10 has a high anti-inflammatory activity both in the function of lymphocytes as monocytes. This decreases the cytokine production of a series of pro-inflammatory cytokines as IL1, TNF-α and IL6. The levels of gene expression of TRL4 were determined by real-time PCR and normalized to the levels of expression of the gene constituent HPRT. There was a significant decrease in the expression of mRNA of the gene TLR4 in culture of human PBMC only to the concentration of 3 g μ These data suggest that some component of crude that ant poison takes effect in modulating the expression of TLR4 and potent antiinflammatory effect.

Keywords: venom, TLR4, cytokines

Introdução

O veneno está presente em várias espécies de insetos. Entre os casos mais graves de envenenamento em humanos, estão os causados por Himenóptera. O veneno dos himenópteros é constituído de complexos de moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos, aminas vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e algumas enzima, tais como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (Edstrom, 1992; Lima e Brochetto-Braga, 2003).

Os estudos mais extensivos da caracterização do veneno dentre os himenópteros são do grupo das abelhas sociais, principalmente *Apis*, no entanto, apenas algumas vespas sociais (*Vespula*, *Vespa* e *Polistes*) e espécies de formigas têm sido estudadas (Blum, 1978).

A maioria dos estudos tem sido realizado com as subfamílias Myrmicinae, Ponerinae e Formicinae. Essas pesquisas mostraram que o veneno de formigas da subfamília Formicinae é constituído de mistura simples de ácidos orgânicos, enquanto das subfamílias Ponerinae e Myrmicinae é uma mistura complexa de proteínas e neurotoxinas. As enzimas encontradas são as mesmas que ocorrem nos demais himenópteros (Edstrom, 1992).

As espécies de formiga do gênero *Dinoponera*, e outras espécies da subfamília Ponerinae, pertencem a um grupo de formigas de interesse médico. A reação comum a uma ferroada é uma forte dor local, seguida por eritema e edema. (Hoffman et.al., 1984).

Haddad Junior e colaboradores (2005) relataram os aspectos clínicos de um paciente que sofreu picada de *Dinoponera gigantea*, observando edema, eritema e dor excruciante. A evolução do envenenamento levou a fenômenos sistêmicos imediatos como: sudorese fria, náuseas, vômitos, mal estar, taquicardia e linfadenopatia. Após três horas, a dor intensa persistia e a vítima apresentou um episódio de hematoquesia. O uso de medicamentos analgésicos, água quente e gelo não melhorou a dor, que somente diminuiu após oito horas, tendo permanecido por cerca de 24 horas.

Os eventos fisiopatológicos após o envenenamento por picada de Himenóptera foram amplamente investigados. Constatou-se que componentes do

veneno do inseto podem ter efeitos tóxicos diretos ou podem provocar sensibilização e, depois resultar em reações alérgicas a picadas subseqüentes (Mosbech et al.,1991).

Em adição a sinal especifico e sintomas diretamente relacionados aos componentes do veneno, os indivíduos desenvolvem uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica. Os componentes dos venenos induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e dano tecidual. Citocinas inibitórias, que exercem efeitos negativos sobre as células ou inibem a síntese e a função de outras citocinas, também têm sido descritas em resposta a rede celular (Voronov et al., 1999)

As citocinas são um grupo heterogêneo de mediadores celulares peptídicos associados à ativação do sistema imune e às respostas inflamatórias. Muitas agem localmente, mas algumas exercem suas funções quando entram na circulação. Os vários tipos de citocinas incluem as interleucinas (IL), os fatores de necrose tumoral (TNF), os interferons (IFN), os fatores estimulantes de colônia da medula óssea e uma variedade de outros fatores de crescimento (Hopkins, 1990). Citocinas tais como as interleucinas (IL) 1, 2 e 6, e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) têm sido propostos como sinais que ativam respostas centrais controladas por insultos sistêmicos e infecções (Akira et al., 1990).

Os receptores *Toll-like* são proteínas transmembranas caracterizadas por seqüências extracelulares repetidas ricas em leucina capazes de reconhecer um amplo grupo de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) de diferentes espécies de microrganismos e fundamentais para a ativação da resposta imune inata (Matsushima et al.,2007).

Nos indivíduos sensíveis a veneno, a reação ocorre dentro de segundos ou minutos após a inoculação. Bonay e colaboradores (1997) observaram uma diferença significativa de respostas das células T ao veneno de *Vespula* em indivíduos alérgicos e não alérgicos.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o perfil de citocinas em cultura de células sanguíneas *in vitro* estimulado com veneno de *Dinoponera australis* e analisar a expressão do receptor Toll-like 4 em células mononucleares do sangue periférico humano, também, estimuladas com o mesmo veneno

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e no Laboratório Clínico da Universidade Federal do Triangulo Mineiro.

Material Biológico

Foram utilizadas formigas *D. australis* capturadas quando forrageavam nas proximidades de ninhos localizados no *Campus* Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG – S 18º 55'; W-GR 48º 17'). Após a captura, os indivíduos foram levados ao laboratório para manipulação experimental.

Extração do veneno

Para extração do veneno, cada indivíduo foi imobilizado com pinça entomológica e sua gáster colocada em um tubo de microcentrífuga. A formiga foi estimulada manualmente a liberar o veneno no tubo e, em seguida, foi acrescentado tampão PBS (1X pH 7,5). O material foi conservado em freezer a -20℃. Para a quantificação de proteínas, as amostras foram submetidas à dosagem segundo método de Bradford (Bradford 1976).

Obtenção e cultivo de sangue periférico

A coleta de sangue periférico foi realizada em 3 voluntários maiores de 18 anos com aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sendo o número do protocolo de aprovação 1079. O sangue venoso periférico (18 mL) foi previamente coletado e misturado com 8 volumes de meio RPMI 1640 (LGC). Um mililitro do volume foi dispensado em 24 poços de placa de cultura. A cultura foi estimulada com diferentes concentrações de veneno bruto (0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 3,. µg/mL). O controle foi feito sem a adição de veneno bruto. As placas foram incubadas em estufa a 37ºC por 24h com 5% de CO_2. As culturas foram então centrifugadas

(600*g* por 15 min), e o sobrenadante foi estocado a -80ºC para a posterior realização da dosagem de citocinas.

Obtenção e cultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

A partir do sangue periférico previamente coletado e colocados em solução de *ficoll-hypaque* em tubo *falcon*, fez-se a centrifugação a 400 rpm por 45 minutos a 18°C. Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de ficoll e o plasma. O plasma foi retirado cuidadosamente e o anel de células coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo *falcon* de 50.0 mL. O excesso de ficoll foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30.0 mL de RPMI em cada lavagem, a 4°C e a velocidade de 294 g por minuto. As células foram finalmente ressuspensas em 5,0 ml de RPMI (LGC) contendo 4,75 g/L de Hepes, 10% de soro humano AB+ inativado, 1% de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina. A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

Viabilidade celular

A citotoxicidade do veneno bruto de *D. australis* foi avaliada pela viabilidade celular de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) utilizando a análise de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) como descrito por Mosmann e colaboradores (1983). Células mononucleares do sangue periférico humano (1×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, em triplicata, com meio RPMI completo na ausência ou presença de veneno nas seguintes concentrações: 3 µg, 6 µg e 12 µg por 24 hs a 37°C e 5% CO_2. Como controle, células foram incubadas somente com meio. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de azul de tiazolil (MTT, Sigma Chemical Co.) na concentração de 5 mg/mL em 90 µL de meio RPMI completo, 4 hs antes do final da cultura. O sobrenadante foi removido e as

partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram então solubilizadas com 100 µL/poço de solução 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor automático de ELISA (BIORAD 2550 READER EIA).

Dosagem de citocinas por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

As citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura de sangue periférico foram dosadas por ELISA utilizando pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis. Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, recobertas com anticorpos monoclonais específicos para a captura de citocinas a serem dosadas. Os poços correspondentes ao branco da reação não contenham anticorpos. Em duas colunas de cada placa foram adicionados 100 ml de citocinas padrão recombinante, seguindo diluições seriadas 1:2 em PBS, contendo 5% de FCS (soro fetal bovino) a partir das concentrações iniciais. Às outras colunas foram adicionados 100 µL/poço de sobrenadante de cultura contendo a citocina a ser dosada. As placas foram incubadas a 37°C, por uma hora e lavadas por seis vezes com uma solução contendo PBS-Tween 20% (PBS-T). A seguir foram adicionadas 100 µL/poço de anticorpos anti-citocina a ser dosada, marcados com biotina, diluída 1:1000 em PBS-T. As placas foram reincubadas por 1 hora, a temperatura ambiente e, novamente lavadas por 6 vezes em PBS-T. Após esta etapa, foram adicionadas 100 µl/poço de avidina marcada com fosfatase alcalina, diluída 1:1000 em PBS-T. As placas foram incubadas por 1 hora e lavadas por 6 vezes com PBS-T, quando então foram adicionados 100 µL/poço de substrato DNP. Os resultados foram obtidos pela diferença entre as absorbâncias de 405 e 490nm (Abs_{405} – Abs_{490}), medida no leitor automático de ELISA (BIORARD 2550 READER EIA). A concentração de citocinas nos sobrenadantes foi determinada em pg/mL, pela comparação com as absorbâncias obtidas em curva padrão da respectiva citocina recombinante realizada simultaneamente, como controle. Foram dosadas as citocinas IL10 (BD Opt EIATM - Human (IL-10) ELISA Set), IL12 (BD Opt EIATM - Human (IL-

12(P40) ELISA Set) e TNF-α (BD Opt EIATM - Human (TNF-α) ELISA Set). A variação de detecção dos testes foi de 37,8 a 500 pg/ mL para TNF-α; 7,8 a 500 pg/mL para IL-10 e 31,2 a 2000 pg/mL para IL-12p40.

Análise estatística

O teste de Mann Whitney foi usado para comparar os valores de citocinas referentes às diferentes dosagens de tratamento com veneno bruto. Os gráficos e as análises estatísticas referentes aos níveis de citocinas foram realizados utilizando o programa Statview for Windows versão 4.57 (Abacus Concepts, Inc., Copyright 1992-1996). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total de $1x10^6$ células PBMC foi feita pelo método do TRIzol (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. Foram adicionados 0.5 mL nas células, agitado em vórtex e incubado por 5 minutos a 30°C. Foram adicionados 0.2 mL de clorofórmio para cada mL de trizol, agitando-se por 15 segundos e incubando-se a 30°C por 2 minutos, seguidos de centrifugação a 12000 *g* por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo de eppendorf ao qual foram adicionados 500 μL de isopropanol para cada mL de trizol. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugando-se a 12000 g por 10 minutos, a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 75 % e centrifugado a 7550 *g* por 5 minutos à 4^0C. Depois de secagem ao ar, o material foi ressuspendido em H_2O/DEPC, quantificado a 260 nm e a integridade analisada em gel de agarose 1%.

Para a reação de transcrição foi utilizado 1 μg de RNA total misturado a 500 μM de dNTP e 100 *p*mol de Oligo pdN6 (oligos aleatórios curtos), tampão 1 X, 5 mM de $MgCl_2$, 10 μM de DTT, 1 U de RNase out (Invitrogen) e 200 U de Super Script II (Invitrogen), completando-se o volume com H_2O/DEPC para 20 μL. A reação foi incubada por 42^0C por 1 h.

Quantificação relativa de mRNA TLR4 por PCR Tempo Real

As reações de RT-PCR foram realizadas para TLR4 (receptor toll like 4) e HPRT (gene constitutivo humano), em placas de leitura óptica de 96-well, em triplicata. Cada reação continha 1 X SYBR Green PCR Master Mix (Apllied Biosystem), 5.0 pmol de cada *primer*, 1 µL cDNA em um volume final de 10 µL (completado com água MiliQ).

As reações de PCR foram feitas com 40 ciclos em ABI 7700 Sequencer Detector (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50ºC por 1 min, 95ºC por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95ºC por 15 segundos e 60ºC por 1 min.

O C_T (cicle treshold) foi definido como o primeiro ciclo no qual ocorre um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de PCR. Os valores do C_T foram calculados pelo *real-time sequencer detection software* (Applied Biosystems) e foram usados para calcular a expressão do mRNA do gene TLR4 relativo ao mRNA do gene normalizador HPRT. Os níveis de expressão foram calculados relativos às células controle (não estimuladas) usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$(Livak and Schittgen 2001).

Os p*rimers* para os genes TLR4 e HPRT foram desenhados usando *Primer* Express *software* (Applied Biosystem). As seqüências dos *primer* do TLR4 foram: Forward CCAAGAACCTGGACCTGAGC e reverse AGAGAGGTGGCTTAGGACC TGAGC e do HPRT foram Forward ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT e reverse TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG.

Resultados e Discussão

Viabilidade celular (MTT)

A análise de viabilidade celular utilizando a redução do MTT em PBMC mostrou que a estimulação dessas células nas concentrações de 6 e 12 ug de veneno bruto de *D. australis* apresentaram uma significativa ($p<0.05$) redução do MTT. Demonstrando que estas concentrações alteram o metabolismo energético destas células, podendo ser tóxico, diminuindo a viabilidade celular. Devido a isso, para os testes realizados em seguida, utilizou-se a concentração igual e abaixo de 3 µg/µL

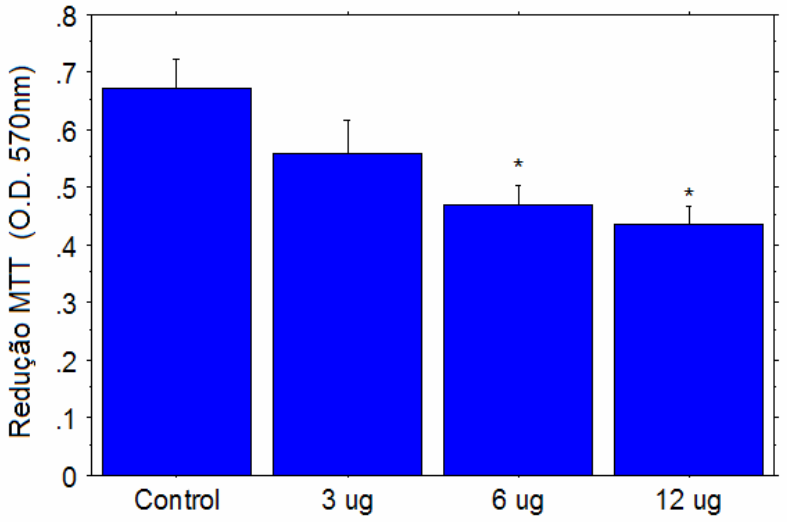

Figura 1: redução do MTT por PBMC estimulada com diferentes concentrações de veneno de *D. australis.* * representa diferença significativa entre a amostra e controle ($p<0,05$), Teste de t.

Efeitos do veneno bruto na produção de citocina anti e pró-inflamatória

Os resultados obtidos mostram que o veneno de *Dinoponera australis* estimulou a produção de IL-10 em cultura de sangue total em todas as

concentrações analisadas (Figura 2). A IL-10 tem uma alta atividade anti-inflamatória tanto nas funções de linfócitos como de monócitos (Fiorentino et al 1991). Esta citocina diminui a produção de uma série de citocinas pró-inflamatoria como IL1, TNF-α, IL6 (Seitz et al., 1995).

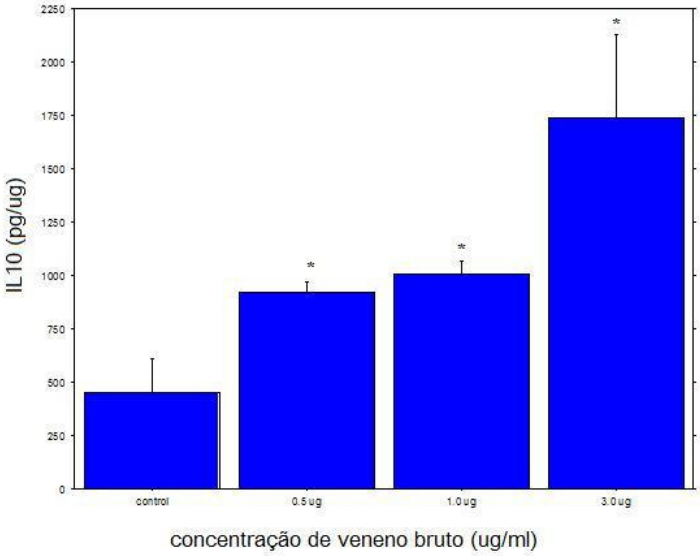

Figura 2: Quantificação de IL10 produzida por cultura de sangue periférico após 24h de estimulo com veneno de bruto de *D. australis*. * representa diferença significativa entre a amostra e controle ($p<0,05$).

Foi verificada uma diminuição significativa ($p<0.05$) da produção de TNF-α no sangue total quando estimulado com o veneno (Figura 3) após 24 horas em comparação com células não estimuladas (controle), entretanto não houve diferença significativa na produção de IL-12p40 (Figura 4).

Os resultados mostram que o veneno de *D. australis* tem algum componente com alta atividade inflamatória devido a estimulação de uma produção significativa de IL-10 (antiinflamatória) que provoca uma diminuição na produção de INF-γ (inflamatória). Isomaki e colaboradores (1996) sugerem que IL-10 seja o maior regulador da produção de TNF-α em juntas artríticas.

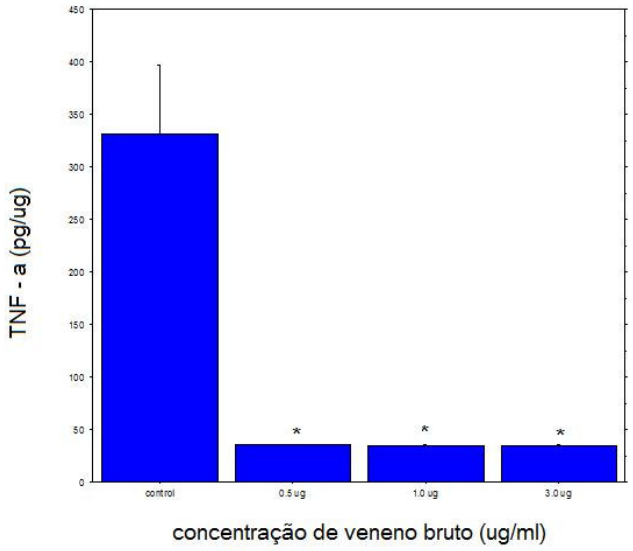

Figura 3: Quantificação de TNF-α produzida por cultura de sangue periférico após 24h de estimulo com veneno de bruto de *D. australis*. * representa diferença significativa entre a amostra e controle (p<0,05).

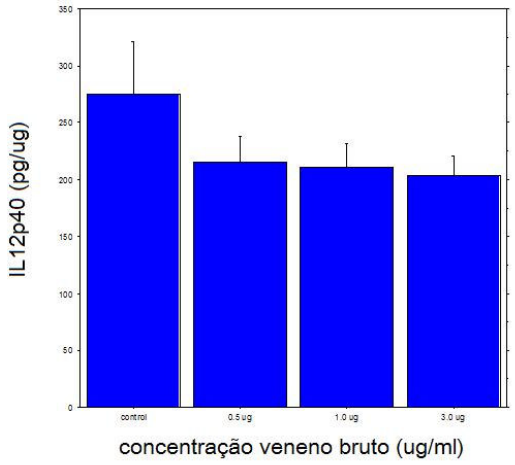

Figura 4: Quantificação de IL12p40 produzida por cultura de sangue periférico após 24h de estimulo com veneno de bruto de *D. australis* * representa diferença significativa entre a amostra e controle (p<0,05).

Administração de IL-10 em voluntários sadios induz a diminuição de linfócitos circulantes CD2, CD3, CD4 e CD8 com supressão de indução mitogênica da proliferação de células T e redução da produção de TNF-α e IL-1b em sangue total estimulado com endotoxina ex-vivo (Chernoff et al., 1995). Indivíduos asmáticos apresentam significativa redução de mRNA de IL10 e proteínas expressas em macrófagos alveolares (Borish et al., 1996; John et al.,1998)

Interleucina 10 já foi citada como moduladora de dor inflamatória. Poole e colaboradores (1995) demonstraram que a IL10 tem propriedades antinociceptivas diminuindo a hiperalgesia induzida por carragenina, bradicina, TNF-α e IL-6, mas não por IL8 e $PGGE_2$ já que IL-8 induz a produção de aminas simpaticomiméticas (Cunha et al., 1991) e PGE2 é um mediador final de nocicepção inflamatória (Ferreira,1972) eventos que não são inibidos por IL10. Nos resultados apresentados houve uma diminuição, mas não significativa na produção de IL1-12p40.

O veneno dos insetos é composto por substâncias que são responsáveis por sua toxicidade; são moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos e aminas vasoativas, incluindo dopamina e histamina (Lima e Brochetto-Braga, 2003)

Diferentes trabalhos mostram atividades antiinflamatórias em himenopteras. Pan e Hink (2000) demonstraram a propriedade antiinflamatória do veneno da formiga *Pseudomyrmex triplarinus*. Neste estudo foi observado que a mirmexina, um complexo de proteínas presente no veneno desta formiga, possui ação inibitória contra edema induzido em patas de camundongos.

Imunoterapia, com o veneno de abelha, tem sido empregada na medicina tradicional para o tratamento de diferentes doenças tais como artrite, reumatismo, câncer entre outros. O veneno de abelha contém uma variedade de peptídeos (melitina, apamina, adolapina, peptídeos com ação enzimática, entre outros) com uma variedade de características farmacêuticas (Hider, 1988; Son et al, 2007).

O veneno de abelhas pode estimular células Th2 para produzir IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e pequenas quantidades de IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-α e IL-12 também

pode ser induzida por venenos (Akdls et al, 1996; Carballido et al., 1994; Mchugh et al., 1995).

Segundo Nasser e colaboradores (2001), imunoterapia por veneno de vespa está associada a um aumento significativo do número de células positivas para IL-10, mas não para IL-12 ou IFN-γ, sugerindo que a indução de IL-10 pode ser importante em imunoterapia por veneno de vespa e ocorrem independentemente da mudança para um fenótipo Th1.

Quantificação relativa de TLR4 mRNA por PCR Tempo Real

Os níveis de transcritos do gene TLR4 (receptor toll-like 4) foram determinados por PCR tempo-real e normalizados com os níveis de transcrito do gene constitutivo HPRT. Os níveis de expressão foram calculados relativos às células controle (não estimuladas) usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schittgen 2001).

O veneno bruto, na concentração de 3µg, diminui significativamente ($p<0,05$) a expressão do mRNA do gene TLR4 em cultura de PBMC humano (Figura 5).

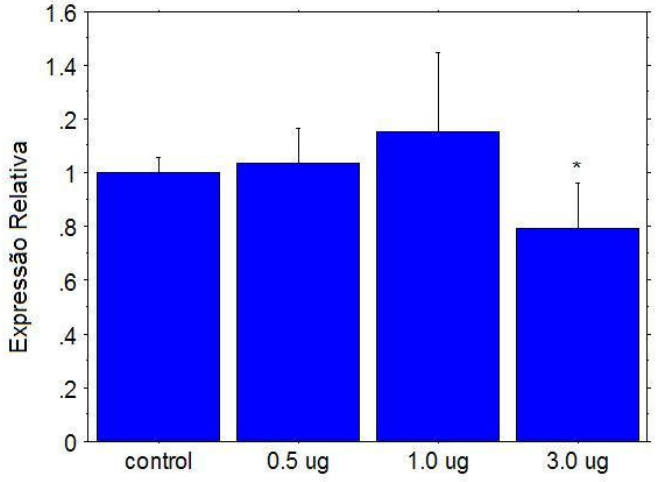

Figura 5: Níveis relativos de transcritos do gene TLR4 detectados por PCR em tempo real em células mononucleares humanas. * representa diferença significativa entre a amostra e controle ($p<0,05$).

A estimulação de diferentes tipos de TLRs tem sido associada ao desenvolvimento de respostas pró ou antiinflamatórias, dependendo do tipo de receptor Toll, da formação ou não de heterodímeros e da via de transdução de sinal utilizada (Matsushima, et al.,2007). A ativação de TLR4 está ligado a expressão de citocinas proinflamatorias e ativação do fator nuclear NFκ-b, sinalizador em vários tipos celulares (Akira et al., 2001, Medzhitov et.al.,1997).

Nas análises realizadas, verificamos uma diminuição significativa na expressão do mRNA de TLR4 em PBMC estimuladas com veneno de *D. australis*. Esse receptor foi escolhido para estudo devido ao aumento da indução significativa de IL10 estimulada pelo veneno. Estudos realizados por Van Lent et al. (2007) com TLR4 de camundongos demonstraram uma redução significativa na produção de IL10 quando o gene desse receptor era nocauteado. Polimorfismo no gene TLR4, em humanos, resulta em menor produção de IL10 demonstrando que essa citocina esta associada a uma resposta do sistema imune inato gerada pelo TLR4 (Dehus et al.,2008).

A diminuição significativa da expressão de TLR4 pode ser devido a um mecanismo de *feedback*, pois se o receptor TLR4 for muito estimulado pelo veneno, provavelmente deve ocorrer uma sinalização para diminuir a expressão do gene, diminuindo os efeitos de ativação exacerbada do receptor. Ou ainda, a própria liberação significativa de IL-10, poderia ligar no receptor de IL-10 e sinalizar para diminuição da expressão de TLR4, que atua num mecanismo antiinflamatório diminuindo a atividade do sistema imune inato.

Este trabalho demonstra o efeito antiinflamatório do veneno de *D. autralis*, podendo ser usado em imunoterapias em doenças inflamatórias.

Conclusões Gerais

- O veneno de *Dinoponera australis* estimula o aumento de IL10; uma citocina antiinflamatória.
- O veneno de *Dinoponera australis* diminui TNF-α; uma citocina pró inflamatória.
- O veneno de *Dinoponera australis* reduz níveis de transcrito de TRL4
- .A técnica *phage display* foi eficiente para o mapeamento de epítopos do veneno de *D. australis.*
- Fosfatase ácida foi uma das proteínas mapeadas por *phage display* e sua presença confirmada no veneno de *D australis* por teste enzimático
- O teste de edema não foi eficiente para analisar o efeito de fagos mimetopos do veneno de *D australis* na resposta imune humoral.

Referência Bibliográfica

Akdls, C.A., Akdls, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S.S.., Muller, U., Blaser, K., 1996. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 *in vitro*. J. Clin. Invest. 98, 1676-83.

Akira S., Takeda K., Kaisho T., 2001 Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol. 2, 675–680.

Akira, S., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T., 1990. Biology of multi-functional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). FASEB, 4, 2860-2867.

Blum, M.S., 1978. Biochemical defenses of insects. In: M. Rockstein (ed). Biochemistry of insects. Academic Press. London, pp. 465-513.

Bonay, M., Echchakir, H., Lecossier, D., Laine, P., Herman, D., Hance, A.J., Soler, P., Tazi, A., 1997. Characterization of proliferative responses and cytokine mRNA profiles induced by *Vespula* venom in patients with severe reactions to wasp stings. Clin. Exp. Immunol. 109, 342-50.

Borish, L, Aarons, A, Rumbyrt, J, Cvietusa,, P, Negri J, Wenzel, S.,1996. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. J Allergy Clin Immunol 97: 1288–1296.

Carballido, J.M., Carbollido-Perrig, N., Oberli-Schammli, A., Heusser, C.H., Blaser, K., 1994. Regulation of IgE and IgG4 responses by allergen specific T-cell clones to bee venom phospholipase A2 *in vitro*. J. Allergy Clin. Immunol. 93, 758-67.

Chernoff, A.E., Granowitz, E.V., Shapiro. L., 1995. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. J Immunol. 154: 5492–5499.

Cotran, R.S., Kumar, V., Tucker, C., 1999. Neoplasia. In *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6th edn. W.B.Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 268–271.

Cunha, F.Q., Lorenzetti, B.B., Poole, S., Ferreira, S.H., 1991. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. Br J Pharmacol. 104(3), 765–767

Dehus, O., Bunk, S., Sonja von Aulock' S. V., Hermann, C., 2008. IL-10 release requires stronger toll-like receptor 4-triggering than TNF: A possible explanation for the selective effects of heterozygous TLR4 polymorphism Asp(299)Gly on IL-10 release Immunobiology (in press)

Edstrom, A., 1992. Venomous and poisonous animals**.** Krieger Publishing Company. Malabar. 210p.

Ferreira, S.H., 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. Nat New Biol. 240(102), 200–203.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mossmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 147, 3815–3822.

Haddad Junior, V., Cardoso, JLC., Moraes, RHP., 2005. Description of an injury in a human caused by a false tocandira (*Dinoponera gigantean*, Perty, 1833) with a revision on folkloric, pharmacological and clinical aspects of the giants ants of the genera *Paraponera* and *Dinoponera* (sub-family Ponerinae). Rev. Inst. Med. Trop**.** 47, 235-238.

Hider, R.C., 1988. Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides. Endeavour 12(2), 60–65.

Hoffman. D., 1984. Insect venom allergy, immunology, and immunotherapy. *In:* TU, AT. *Handbook of neural toxins: insect poisons, allergens, and other intervertebrate venoms. New York: M. Dekker,* p 187-224.

Isomäki, P., Luukkainen, R., Toivanen, P., Punnonen, J., 1996. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis Arthritis and Rheumatism 39(10),1693-1702

John, M., Lim, S., Seybold, J., 1998. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1a, granulocyte- macrophage colony-stimulating factor and interferon-Y release from alveolar macrophages in asthma. Amer J Respir Crit Care Med 157: 256–262

Lima, P.R.M., Brochetto-Braga, MR., 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera.* Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 9 (2), 149-162.

Livak, K.J.,Schittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. Methods. 25, 402–408

Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T ., Taga, M., Yamada, K., Kuroki, Y., 2007.Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. BMC Genomics. 8,124

Mchugh, S.M., Deighton, J., Stewart, A.G., Lachmann, P.J., Ewan, P.W., 1995. Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a Th2 to a Th1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. Clin. Exp. Allergy. 25, 828-38.

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 388, 394–397.

Moldawer, L., 1994. Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. Crit. Care Med. 22, 3-7.

Mosbech, H., Jensen, A., Heinig, J. H., Schou, C., 1991. House dust mite allergens on different types of mattresses. Clinical & Experimental Allergy 21 (3), 351-355,

Nasser, S.M., Ying, S., Meng, Q., Kay, A.B., Ewan, P.W., 2001. Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy. Eur J Immunol.;31(12),3704-3713.

Pan, J., Hink, W. F., 2000. Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus.* Toxicon. 38, 1403- 1413.

Poole, S., Cunha, F. Q., Selkirk, S., Lorenzetti, B. B., Ferreira, S. H., 1995. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. Br J Pharmacol. 115(4), 684–688.

Seitz, M., Loetscher, P., Dewald, B., Towbin, H., Gallati, H., Baggiolini, M., 1995. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. Eur J Immunol. 25, 1129–1132.

Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K., Hong, J.T., 2007.Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacology & Therapeutics 115, 246–270

Van Lent, P. L. E. M., Blom, A. B., Grevers, L., Sloetjes, A. ,Van Den Berg, W. B., 2007. Toll-like receptor 4 induced FcγR expression potentiates early onset of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex arthritis: Toll-like receptor 4 largely regulates FccR expression by interleukin 10. Ann Rheum Dis 66, 334–340.

Voronov, E., Apte, R. N., Sofer, S., 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. J. Venom Anim. Toxins 5, 5-33.