

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO VENENO DAS GLÂNDULAS DE FORMIGAS *ODONTOMACHUS AFFINIS*.

Thamires Regine Corga da Silva Angelo¹; Maria Santina de Castro Morini²; Tiago Rodrigues³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: thamirescorga@hotmail.com¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: morini@umc.br²
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: trodrigues@umc.br³

Área de Conhecimento: Toxicologia

Palavras-Chaves: *Odontomachus affines*, Veneno, Citotoxicidade

INTRODUÇÃO

As formigas são consideradas insetos eusociais, formando sociedades complexas, assim como abelhas e vespas. Pertencentes à ordem Hymenoptera, as formigas estão incluídas em uma única família, Formicidae, sendo que existem mais de 12.000 espécies descritas, distribuídas por todas as regiões do planeta.

Atualmente o número de estudos apontando as formigas como indicadores biológicos têm aumentado significativamente. Estes animais são considerados excelentes bioindicadores devido à possibilidade relativamente rápida e de baixo custo de amostragem, ampla distribuição geográfica, facilidade de identificação e sensibilidade às alterações das condições ambientais (PECK et al., 1998; ANDERSEN et al., 2002). Os estudos com a utilização do veneno, frações ou toxinas isoladas de formigas são pouco encontrados na literatura e, em boa parte, trata-se de relatos de casos, muitas vezes daqueles que buscam estabelecer uma relação com a anafilaxia. Isto se deve ao fato de que, nos acidentes em que ocorre a morte do paciente (o que é bastante raro), o mecanismo desencadeador é o choque anafilático (McGAIN & WINKEL, 2002).

OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é avaliar o efeito citotóxico do veneno extraído das glândulas de formigas *Odontomachus affinis* em células normais (mononucleares de sangue periférico) e células tumorais leucêmicas K562 e HTC. Tal estudo permitirá a execução de uma triagem para a avaliação do potencial citotóxico de substâncias contidas no veneno dessas formigas.

METODOLOGIA

Coleta das formigas. Espécimes de *Odontomachus affinis* serão coletados de ninhos localizados no Parque Natural Municipal Francisco Affonso de Melo, no período da manhã.

Isolamento das glândulas de veneno. A extração de todo o aparelho de ferrão será de forma manual com ajuda de lupa e pinça. As glândulas de veneno das formigas *Odontomachus affinis* serão submersas em uma solução aquosa contendo acetonitrila 30% (v/v) e ácido trifluoroacético 0,2% (v/v).

Cultura celular. As linhagens de células leucêmicas humanas K562 (leucemia mielóide crônica) serão cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (CultiLab), mantidas em estufa com

5% de CO₂ a 37°C. Os repiques serão realizados a cada 72 horas e a viabilidade celular será determinada utilizando o corante de exclusão Azul de Trypan 0,16% (m/v).

As células HTC (*hepatoma tissue culture*) de fígado de rato (*Rattus norvegicus*) foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As linhagens celulares serão cultivadas em meio DMEM high glicose (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com soro bovino fetal 10% (v/v) (CultiLab), glutamina 2 mmol/L, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 mg/ml, pH 7,2, mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Os repiques devem ser realizados a cada 72 horas e a viabilidade celular para realização desses repiques será determinada utilizando o corante de exclusão Azul de Trypan 0,16% (m/v).

Redução de MTT. As células em suspensão serão incubadas em tempos variados com diferentes concentrações das fenotiazinas em uma placa de 96 poços. Após este período, serão adicionados 10µL da solução de MTT (5 mg/mL) seguido de incubação por mais 4 horas. Após isso, os cristais de formazam, formados pela atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, serão solubilizados pela adição de 100 µL de SDS 20 % (m/v) (em HCl 0,01 mol/L) e incubação por 24 horas. Após a leitura em 570 nm, a porcentagem de células viáveis será avaliada em relação ao controle sem adição das drogas (100%) e a concentração inibitória 50% (IC₅₀) será determinada por meio de curva dose-resposta.

Determinação do potencial de membrana mitocondrial. O potencial de membrana mitocondrial será determinado espectrofluorimetricamente (Fluorescence Spectrophotometer Hitachi F-2500, Tóquio, Japão) monitorando-se as alterações de fluorescência da rodamina 123, um fluoróforo catiônico que se distribui eletroforicamente na matriz em resposta a carga negativa da membrana mitocondrial interna (LEMASTERS *et al.*, 1997), usando-se como comprimentos de onda de excitação e emissão 505 e 535 nm, respectivamente. As células (1x10⁶) permeabilizadas com digitonina 0,004% serão incubadas no meio de respiração acrescido de rodamina 123 0,4 µmol/L (volume final de 2 mL) e a energização das mitocôndrias será feita pela adição dos substratos respiratórios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto do veneno causou a morte de células tumorais de forma concentração-dependente, sendo que 100% de morte foi obtido com 1,0 ou 2,0 mg/mL para K562 e HTC, respectivamente. A comparação entre os valores de EC₅₀, ou seja, a concentração responsável pela diminuição de 50% da viabilidade que foi de 0,45 mg/mL para HTC e 0,4 mg/mL para K562 sugere que a linhagem leucêmica é mais sensível ao veneno que a hepática.

Além disso, a adição do veneno em ambas as linhagens celulares tumorais permeabilizadas com digitonina promoveu imediata dissipação do potencial de membrana de mitocôndrias energizadas com succinato. Tal resultado aponta para um possível envolvimento de disfunção mitocondrial promovida por substâncias contidas no veneno na citotoxicidade observada.

Testes feitos com veneno de abelhas *Apis mellifera* em células cancerígenas tipo L929 (tecido conjuntivo de camundongo) mostram que conforme as concentrações de veneno aumentaram, houve o aumento da atividade mitocondrial com 24 horas de incubação (CASTRO *et al.*, 2009). Isso indica que apesar de pertencerem aos grupos dos artrópodes a composição e atuação do veneno são diferentes.

Por haver poucos estudos sobre toxicidade de veneno de formigas, uma análise entre a toxicidade do veneno de outras espécies não é possível atualmente. Posteriormente essa atividade citotóxica observada em células tumorais será comparada com resultados

obtidos em células normais e o mecanismo de morte celular será investigado de forma mais detalhada.

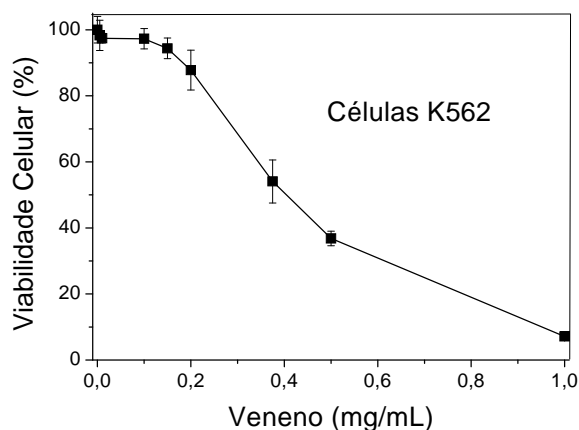


Gráfico 1: Efeito do veneno de *Odontomachus affinis* sobre a viabilidade de células K562. O valor de EC_{50} estimado foi de 0,4 mg/mL.

CONCLUSÕES

O veneno das glândulas de formigas *Odontomachus affinis* possui potente atividade citotóxica em células tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, A.N., HOFFMANN B.D., MÜLLER, W.J., GRIFFITHS, A.D. Using ants as bioindicators in land management: simplifying assessment of ant community responses. *Journal of Applied Ecology*. 39:8-17, 2002.

CASTRO L., GRANATO A. E. C., SIQUEIRA I., WACHESK C. C., SOARES C. P., SILVA N. S., Análise de citotoxicidade do veneno da abelha *Apis mellifera* em cultura

LEMASTERS, L. K. "A Synthesis of Studies Pertaining to Facilities, Student Achievement, and Student Behavior." **Unpublished doctoral dissertation**. (ED447687), Virginia Polytechnic and State University., 1997.

McGAIN, F. & WINKEL, K.D.. Ant sting mortality in Australia. **Toxicon** 40 (8): 1095-100, 2002.

PECK, S. L.; MCQUAID, B.; CAMPBELL, L. Using ant species (Hymenoptera: Formicidae) as a biological indicator of agroecosystem condition. *Environmental Entomology*. 27(5):1102-1110, 1998