

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO VENENO DE *Odontomachus* sp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) NO PROCESSO DA ADIPOGÊNESE EM CÉLULAS 3T3-L1

Magno Alves Lopes¹; Maria Santana de Castro Morini²; Miguel Luiz Batista Jr³

Estudante do Curso de Biologia; e-mail; magnolopes22@hotmail.com¹

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; morini@umc.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; miguelj@umc.br³

Área do Conhecimento: Bioquímica.

Palavras-chave: Adipogênese, Tecido Adiposo, Veneno, *Odontomachus* sp.

INTRODUÇÃO

O tecido adiposo tem como principal função armazenar energia em forma de lipídios até que tornem necessários para o suprimento de energia por diversas partes do corpo. Fazem parte do tecido adiposo células denominadas de adipócitos, porém para que o adipócito amadureça e se torne viável para realizar suas funções é necessário que ele passe pela diferenciação celular denominada adipogênese, onde é caracterizada a conversão de pré-adipócitos a em adipócitos maduros (SERTIÉ, 2010). O processo de diferenciação é altamente controlado pela ativação sequencial de fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/*enhancer binding protein* C/EBPs) (FONSECA-ALANIS *et al.*, 2006; SERTIÉ, 2010). Para uma melhor compreensão das alterações que resultam na formação do adipócito maduro, a linhagem celular 3T3-L1, é amplamente utilizada *in vitro* pela sua similaridade com o tecido adiposo branco, tanto em aspectos morfológicos como em eventos moleculares responsáveis pela adipogênese. Este modelo experimental possui a característica de obter uma população homogênea quando cultivados e por se tratar de uma linhagem celular imortalizada é possível cultivar indefinidamente sem alterar sua funcionalidade (COSTA, 2010). Pertencentes à ordem Hymenoptera, as formigas estão incluídas em uma única família, Formicidae, estudos com a utilização do veneno, frações ou toxinas isoladas de formigas são pouco encontrados na literatura e, em boa parte, são de relatos de casos (ANDERSEN *et al.*, 2002), porém um estudo importante realizado com a extração do veneno das glândulas da formiga *Odontomachus affinis*, demonstrou ter atividade citotóxica em células tumorais, no entanto nada se sabe a respeito da ação desse veneno em outros aspectos do metabolismo da célula (PAZINI, 2013).

OBJETIVO

Avaliar a atividade do veneno extraído das glândulas da formiga *Odontomachus* sp. no processo da adipogênese em células 3T3-L1.

MÉTODOLOGIA

Coleta das formigas e processamento do veneno: Os ninhos da formiga *Odontomachus* sp. foram selecionados no Parque Natural Municipal Francisco Affonso de Mello e identificadas como *Odontomachus affinis* pertencentes à subfamília Ponerinae, foram coletadas 200 formigas semanalmente e colocadas uma a uma em frasco de plástico

contendo serapilheira que por sua vez estava dentro de um isopor contendo gelo. Foi realizado a extração da glândula de veneno com o auxílio de pinça e lupa, foram adicionados 100 glândulas de veneno em um micro-tubo contendo 1ml de PBS, em seguida as glândulas foram maceradas no aparelho *Bullet Blender* e centrifugados a 4°C por 5 min a 1500 RPM, o sobrenadante foi filtrado em um filtro de 0,22µm e armazenado no freezer a -22°C até o momento de sua utilização. As proteínas foram quantificadas com o kit *BCA Protein Assay*, a absorbância foi lida pelo aparelho *Synergy* e foi realizada a avaliação da densidade das proteínas em géis de poliacrilamida a 15% SDS, posteriormente foi realizada coloração a base de Comassie Blue. Ensaio celulares e testes com o veneno: Células 3T3-L1 foram plaqueadas a 1×10^4 em placas de cultura de 96 poços em triplicata (n=3) e cultivadas em DMEM suplementados com 10% Bovine Serum e 2% antibióticos, foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de gás carbônico (CO²), para avaliar a toxicidade do veneno foram realizados testes com PBS diluído à 1/10 em meio de cultura e as diluições de veneno de 1/10, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700 e 1/800 diluído com meio de cultura. As células, com a presença do veneno, foram incubadas por 24 horas; em seguida foram coradas com azul de Tripán e contadas na câmara de Neubauer. De acordo com os resultados obtidos no teste de viabilidade celular foram determinadas as concentrações ideais para realizar os testes na adipogênese que foram 1/50, 1/100, 1/400 e 1/700. A diferenciação dos pré-adipócitos foi estimulada com meio DMEM suplementado com 1µM de dexametasona, 0,5mM de IBMX e 1,67µM de insulina suplementado com 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) ao final do protocolo de diferenciação (dia 10), os adipócitos foram corados com *OilRed-O* em seguida os TGAs corados nas células foram quantificados por espectrofotometria a 492nm no equipamento *Synergy*. Análise estatística: Os dados serão expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística utilizada será a análise de variância (ANOVA) em uma via, seguida do pós-teste de Tukey. O valor adotado para significância foi $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteínas totais verificado pelo método de *BCA Protein Assay* determinou uma concentração de 8,32µg/µl de veneno e as bandas encontradas no gel variaram de 20 a 260 kDa, densidade de proteínas bem maiores do que as encontradas por Santos e colaboradores (2012) na formiga *Pachycondyla verenae* (Ponerinae) que obtiveram a concentração de 50µg/mL de proteína e bandas de 12 a 99 kDa, outros trabalhos avaliaram que o veneno dos himenópteros é constituído de por lipídios, aminas vasoativas e algumas classes de enzimas, como por exemplo, fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (SANTANA, 2008). A citotoxicidade do veneno bruto de *O. affinis* foi avaliada pelo método azul de Tripán, através da análise da viabilidade celular após 24 horas de incubação com o extrato do veneno bruto. Em todas as diluições testadas, somente a diluição de 1/10 de veneno teve significância estatística, sendo ela que matou 100% das células em cultura, as demais diluições não houve significância estatística em relação à morte celular, como pode ser observado no gráfico 01.

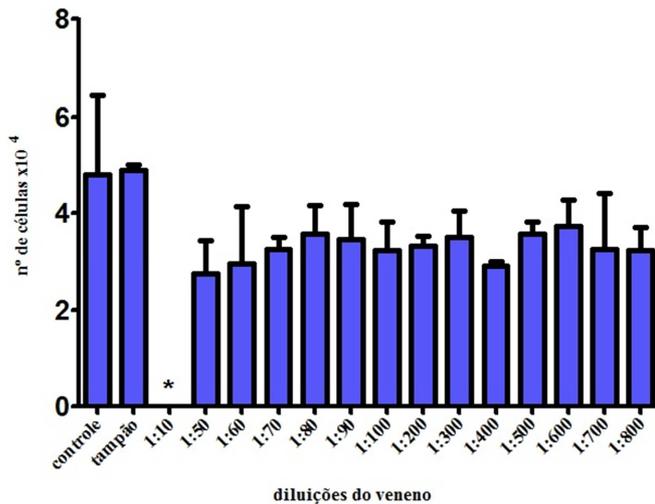


Gráfico 01: Número de pré-adipócitos 3T3-L1 contadas pelo método azul de Tripán após 24 horas de incubação com o veneno de *O. affinis* em diferentes diluições, plaqueadas a 1×10^4 . Diluição do veneno de 1/10 com significância estatística (n=3).

No décimo dia de diferenciação as células foram coradas com *OilRed-O*, com o intuito de corar os TAGs armazenados nos pré-adipócitos em diferenciação (Figura 01). Adicionalmente, avaliou-se também os níveis de *OilRed-O* nos poços em cultura. Considerando a especificidade do *OilRed-O* na ligação com o TAG, a leitura no comprimento de onda em 492 nm apresenta relação entre a maior a absorbância obtida e o maior nível de TGAs, logo, sugere-se que quanto maior a absorbância, maior o numero de células em diferenciação.

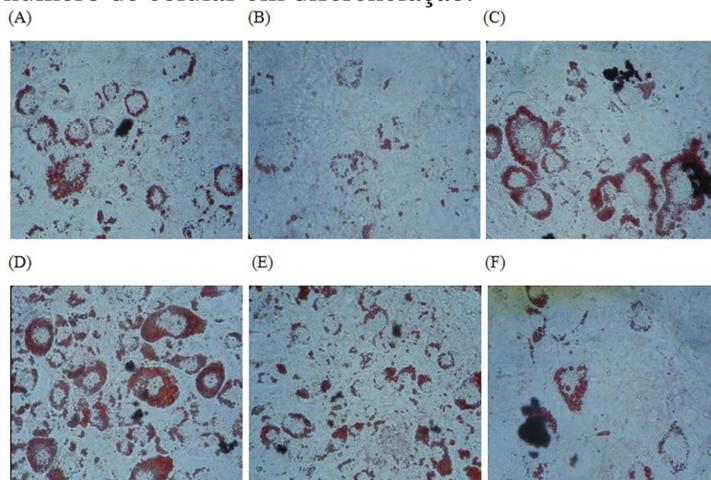


Figura 01: Pré-adipócitos no décimo dia de diferenciação com TAGs armazenados corados com *OilRed-O*; (A) controle, (B) tampão, (C) veneno diluído 1/50, (D) veneno diluído 1/100, (E) veneno diluído 1/400 e (F) veneno diluído 1/700. (aumento de 40x)

Foi possível observar um maior aumento de células diferenciadas na concentração de 1/100, sugerindo que o veneno tem um fator pró-adipogênico. A placa corada foi então submetida à quantificação por espectrofotometria para determinar os níveis de TGAs corado com *OilRed-O* presentes em cada cultura, obtendo seguintes valores: 0,097nm (controle), 0,15nm (tampão), 0,144nm (1/50), 0,219nm (1/100), 0,159nm (1/400) e 0,157nm (1/700). Dado o exposto, a quantificação demonstrou que o nível de corante detectado no veneno com concentrações de 1/100 está aumentado 146% em relação ao controle, o que reforça os dados de que o veneno pode ter um fator pró-adipogênico. Atualmente não há estudos verificando a ação de venenos de origem animal na adipogênese, porém outros compostos já foram testados, como pode ser visto a atuação de alguns fármacos, como por exemplo, a pioglitazona, onde no trabalho de Beluzi (2012) que testou a pioglitazona em ratos com caquexia induzida, obteve o resultado que a mesma retardou o avanço da caquexia nos primeiros momentos da síndrome, aumentando a sobrevida e ativando a expressão de genes que aumentou o TAB, ou seja, ela tem fator pró-adipogênico. Porém ainda precisa de outros testes para

avaliar essa hipótese da ação do veneno nesta concentração e qual o composto responsável por isso.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos nos resultados desse estudo estão conforme ao objetivo proposto, sendo que as principais conclusões que se pode ter são:

1. Entre as diluições utilizadas no teste de viabilidade nas células 3T3-L1, não houve variação significativa na proliferação das células em presença do veneno diluído a 1/50 até 1/800, sendo que a diluição de 1/10 ou menor houve 100% de mortes, enquanto as demais diluições a média de crescimento celular esteve 30% mais baixo do que o controle.
2. Ao decorrer da adipogênese, houve uma aceleração no armazenamento de TGAs nas células com a diluição do veneno de 1/100, sugerindo que a mesma obteve a diferenciação melhor sucedida, logo, o veneno pode ter um fator pró-adipogênico nesta concentração.

REFERÊNCIAS

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**, 2002.

BELUZI, M. E. A. Pioglitazona modula os efeitos da caquexia associada ao câncer e aumenta a sobrevivência de ratos wistar. Universidade de Mogi das Cruzes. **Núcleo Integrado de Biotecnologia**. 2012.

COSTA, A. G. V. Regulação da adipogênese e da secreção de quemerina por ácidos graxos de cadeia média e pelo ácido graxo eicosapentaenóico em células 3T3-L1. **Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010.

FONSECA-ALANIS, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo**, v. 50, n. 2, 2006.

PAZINI, P. S. Estudo do potencial citotóxico do veneno de formigas *Odontomachus affinis*. Universidade Federal do ABC. **Centro de Ciências Naturais e Humanas**. 2013.

SANTANA, F. A. Imunogenicidade do veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). Universidade Federal de Uberlândia, **Instituto de Genética e Bioquímica**. 2008.

SANTOS, P. P; OLIVEIRA, D. A; SERRÃO, J. E. Proteínas do veneno de *Pachycondyla verena* (Forel, 1922) (Formicida: Ponerinae). Universidade Federal de Viçosa, **Programa de Pós-Graduação em Entomologia**. 2012.

SERTIÉ, R. A. L. Repercussões do destreinamento físico sobre o metabolismo e a celularidade do tecido adiposo branco periepídídimo de ratos. Universidade de São Paulo, **Instituto de Ciências Biomédicas**, 2010.