



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

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES AO  
VENENO DE *Dinoponera australis* (Hymenoptera,  
Formicidae, Ponerinae) POR *PHAGE DISPLAY***

ANA CAROLINA SILVA SIQUIEROLI

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti

CO-ORIENTADOR: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA – MG

2007



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

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES AO  
VENENO DE *Dinoponera australis* (Hymenoptera,  
Formicidae, Ponerinae) POR *PHAGE DISPLAY***

ANA CAROLINA SILVA SIQUIEROLI

ORIENTADORA: Dra. Ana Maria Bonetti

CO-ORIENTADOR: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA – MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

S618i Siquieroli, Ana Carolina Silva, 1982-  
Identificação de peptídeos ligantes ao veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) por phage display / Ana Carolina Silva Siquieroli. - 2007.

61 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.

Co-orientador : Luiz Ricardo Goulart Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Formiga - Teses. 2. Peptídios - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
IV. Título.

CDU: 595.796

---

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



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

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES AO  
VENENO DE *Dinoponera australis* (Hymenoptera,  
Formicidae, Ponerinae) POR *PHAGE DISPLAY***

ANA CAROLINA SILVA SIQUIEROLI

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Dra. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

**Examinadores:** Maurício Bacci Júnior  
Odair Correa Bueno

**Data da defesa:** 08/05/2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas PGGB para o formato da Dissertação foram contemplados

---

Dra. Ana Maria Bonetti

*"Não importa saber se um animal é capaz de pensar, sei que é capaz de sofrer e por isso o considero o meu próximo".*

*(Albert Schweitzer - prêmio Nobel da Paz 1952)*

*Dedico esta tese à pessoa que me fez enxergar a beleza da vida  
e que ainda tão pequenino é o meu maior mestre: meu filho  
Pedro Augusto Siquieroli Martins (meu anjo eterno)!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me possibilitou a oportunidade e a concretização de um sonho.

Aos meus pais e ao meu irmão, que sempre fizeram de tudo para garantir minha felicidade e minha formação. Muito obrigada por me apoiarem em mais esta etapa da minha vida.

Ao meu grande amado marido, que me apoiou, me auxiliou e principalmente, por esta família maravilhosa que estamos construindo.

Ao meu pequenino filho, pelos choros, sorrisos e gargalhadas. Espero que um dia se orgulhe de sua mãe!

Aos grandes e sinceros amigos que me ajudaram na realização deste trabalho. Em especial Flávia Assumpção Santana, Carlos Ueira Vieira, Cynara de Melo Rodovalho, Cristina Soares de Souza e Fausto Emílio Capparelli.

Aos amigos do Laboratório de Genética pelo convívio e apoio.

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

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho por ter se disponibilizado a me auxiliar na conclusão deste trabalho. Obrigada pela dedicação e conhecimentos a mim oferecidos.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Genética e Bioquímica, por disponibilizarem os laboratórios nos quais a pesquisa foi desenvolvida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado, me ajudando a alcançar mais este objetivo. Meu muito obrigada!

## ÍNDICE

	Página
Lista de Abreviaturas.....	Ix
Lista de Abreviaturas para aminoácidos.....	Xi
Lista de Tabelas.....	Xii
Lista de Figuras.....	Xiv
Introdução.....	01
<b>Capítulo 1: Considerações Gerais sobre a Formiga <i>Dinoponera australis</i> (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae).....</b>	<b>04</b>
<i>Dinoponera australis</i> .....	05
Glândula de Veneno.....	08
Referências Bibliográficas.....	11
<b>Capítulo 2: Identificação de Peptídeos Ligantes ao Veneno de <i>Dinoponera australis</i> (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) por Phage Display.....</b>	<b>17</b>
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	22
Material Biológico.....	22
Extração do veneno.....	23
Seleção de fagos ligantes ao veneno.....	23
Titulação .....	24
Amplificação de fagos em <i>Deepwell</i> .....	25
Extração de DNA de fago em placa <i>Deepwell</i>	26
Determinação das Seqüências de DNA.....	26
Bioinformática.....	27



<i>Dot-blotting</i> .....	28
Atividade Hemolítica.....	29
Atividade Nucleásica.....	30
Teste para inativação de partículas de fago pelo veneno de <i>D. australis</i> .....	31
Resultados e Discussão .....	32
<i>Biopanning</i> – Seleção de peptídeos.....	32
Determinação das Seqüências de DNA e Bioinformática.....	33
<i>Dot-blotting</i> .....	49
Atividade Hemolítica.....	49
Atividade Nucleásica.....	52
Teste para inativação de partículas de fago pelo veneno de <i>D. australis</i> .....	53
Referências Bibliográficas.....	54
<b>Conclusões Gerais</b> .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
µL	Microlitros
M	Molar
Mm	Milimolar
Ng	Nanogramas
µg	Microgramas
g	Grama
h	Hora
min	Minuto
seg	Segundos
rpm	Rotações por minuto
pmol	Picomoles
pH	Potencial Hidrogeniônico
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
V	Volts
DO	Densidade ótica
IPTG	Isopropil α-D-tiogalactosise
PBS	Tampão Salina Fosfato
PBST	Tampão Fosfato de sódio com tween 20 0.5%
TBS	Tampão Tris-NaCl
TBST	TBS com Tween 20 0,05%
PEG	Polietileno glycol
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage display</i> New England Biolabs
Ph.D- 12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos

pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVI	Proteína VII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína VII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
pIX	Proteína IX capsídica de bacteriófagos filamentosos
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
Pfu	Unidades formadoras de colônias
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- $\alpha$ -D-galactosideo
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt
BSA	Soro albumina bovina
Tris-HCL	Tris Hydrochloride
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaN <sub>3</sub>	Azida sódica
NaCL	Cloreto de sódio
Nal	Iodeto de sódio

## 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

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2		Página
<b>Tabela 1:</b>	Amostras e respectivas concentrações utilizadas no teste de atividade hemolítica. <b>C:</b> Controle (Tampão PBS sem veneno); <b>V<sub>1</sub>:</b> veneno bruto; <b>F: Fago; Dino1 – Dino8:</b> clones escolhidos aleatoriamente incubados com veneno).	<b>30</b>
<b>Tabela 2:</b>	Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a proteínas do veneno de <i>D. australis</i> . Título obtido (pfu) no processo de <i>biopanning</i> .	<b>32</b>
<b>Tabela 3:</b>	Seqüência de aminoácidos, respectivos clones, freqüência observada, freqüência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.	<b>34</b>
<b>Tabela 4:</b>	Freqüência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados, a freqüência observada e a freqüência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AAFREQ. Em cinza estão marcados os aminoácidos mais freqüentes. Em vermelho os aminoácidos que apresentaram seleção negativa e em verde seleção positiva.	<b>37</b>

<b>Tabela 5:</b>	Análise de Bioinformática dos peptídeos selecionados por <i>Phage Display</i> em veneno de <i>D. australis</i> contra proteínas de Humanos e Insetos.	<b>41</b>
<b>Tabela 6:</b>	Análise de Bioinformática dos motivos encontrados pelo programa MOTIF2 contra proteínas de Humanos e Insetos. Em colorido os motivos.	<b>45</b>
<b>Tabela 7:</b>	Resultados obtidos no teste de inibição da atividade hemolítica dos fagos conjugados com veneno de <i>D. australis</i> . <b>C:</b> Controle (Tampão PBS sem veneno); <b>V<sub>1</sub>:</b> veneno bruto; <b>F:</b> Fago; <b>Dino1 – Dino8:</b> clones incubados com veneno).	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b>	Operária de <i>Dinoponera australis</i> .	<b>07</b>
<b>Figura 2:</b>	Diagrama da anatomia da glândula de veneno de <i>Dinoponera australis</i> . Túbulos de secreção (ST), reservatório de veneno (R), glândula com convoluções (CG) e ducto de veneno (D). Escala da barra (para a glândula de veneno inteira) = 2 milímetros (Schoeters e Billen 1995).	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b>	Operária de <i>D. australis</i> carregando sua presa.	<b>22</b>
<b>Figura 2:</b>	Esquema da seleção de fagos ligantes ao veneno de <i>D. australis</i> .	<b>27</b>
<b>Figura 3:</b>	Gráfico gerado pelo programa DIVAA que mede a diversidade na sucessão dos 12 aminoácidos em cada posição nos peptídeos, sendo que cada 0,5 ponto representa um aminoácido e o primeiro aminoácido encontra-se no ponto 1.	<b>39</b>
<b>Figura 4:</b>	Alinhamento dos 21 peptídeos selecionados pelo programa CLUSTAL W (v. 1.83). Os motivos alinhados estão marcados em colorido. Os peptídeos sem marcas coloridas não apresentaram alinhamentos satisfatórios.	<b>47</b>

- Figura 5:** Análise por *dot-blotting* da expressão do ligante ao veneno de *D. australis*. **a:** Dino1; **b:**Dino2; **c:** Dino3; **d:** Dino4; **e:** Dino5; **f:** Dino6; **g:** Dino7; **h:** Dino8; **i:** Controle negativo; **j:** Controle positivo da reação (fago helper impresso na membrana e incubado com um dos clones). **49**
- Figura 6:** Atividade nucleásica do veneno de *D. australis*. **1:** 200 ng de DNA de fago M13, Controle. **2:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 10µg veneno de *D. australis*. **3:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 5µg veneno de *D. australis*. **4:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 2,5µg veneno de *D. australis*. **5:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 1,25µg veneno de *D. australis*. **6:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 0,75µg veneno de *D. australis*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **52**



---

---

# INTRODUÇÃO

---

---

A formiga *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) é um material biológico que desperta grande interesse científico. Uma de suas características principais é a ausência de fêmea reprodutiva distinguível e a reprodução é garantida por operárias fertilizadas, chamadas de *gamergates*. Trata-se de uma formiga primitiva, que se alimenta de outros insetos, vive em ninhos subterrâneos de 50 a 120cm de profundidade, com 14 operárias em média.

Até o momento, pouco se sabe a respeito dessa formiga, fato que tem estimulado a busca de informações sobre sua biologia e comportamento, com o intuito de acrescentar dados científicos para prover a pesquisa de himenópteros da região do Triângulo Mineiro. Além disso, nas proximidades de nosso Centro de Pesquisa existem alguns ninhos que têm nos possibilitado, além do estudo molecular, o estudo do comportamento dessas formigas, através de observações da alimentação, disputa de território, atividades de manutenção do ninho, como limpeza e proteção contra predadores, entre outros.

Em 2005, o Ministério do Meio Ambiente classificou as formigas do gênero *Dinoponera* em perigo de extinção. Tal informação aumentou ainda mais nossos esforços em conhecer mais sobre esse inseto e, desta forma, poder preservar os exemplares ainda existentes.

A presença da glândula de veneno é outra característica de destaque em *D. australis*, tanto pelo veneno desencadear reações alérgicas sérias em humanos, quanto por fornecer informações importantes sobre a função das biomoléculas componentes. Dentre os Hymenoptera, o grupo de abelhas sociais, principalmente *Apis*, é um dos mais estudados. Muitas substâncias com propriedades terapêuticas já foram isoladas do veneno destes animais e têm sido amplamente utilizadas em pesquisas básicas e no entendimento de mecanismos antiinflamatórios. Entre as formigas, poucas são as informações disponíveis.

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

O presente estudo teve como objetivo identificar peptídeos ligantes ao veneno de *D. australis*, para, desta forma, poder subsidiar análises posteriores

quanto á presença de substâncias que possam ser exploradas quanto ao potencial terapêutico, além de contribuir com informações científicas sobre a formiga *D. australis*.

Para o desenvolvimento deste estudo, foi utilizada a técnica de *Phage Display* que consiste na exposição de peptídeos exógenos na superfície de fagos filamentosos, vírus que infectam células bacterianas. Esta técnica tem sido amplamente empregada com a finalidade de identificar ligantes através de interações moleculares e obter informações sobre a relação receptor-ligante.

É um estudo pioneiro na área e contribui para aumentar as informações disponíveis sobre a formiga *D. australis* e de seu veneno.

O presente trabalho foi desenvolvido em dois capítulos, sendo que o primeiro relata os aspectos gerais da formiga e de sua glândula de veneno. O segundo capítulo mostra os resultados obtidos, por meio da técnica de *Phage Display*, na identificação de peptídeos ligantes específicos ao veneno de *D. australis*.

---

---

# CAPÍTULO 1

---

---

**CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FORMIGA**  
***Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae,**  
**Ponerinae)**

## ***Dinoponera australis***

Para Hölldobler e Wilson (1990) o sucesso ecológico das formigas por mais de 50 milhões de anos parece estar relacionado ao fato de terem sido um dos primeiros insetos predadores a explorar o solo e a vegetação da terra, desempenhando papel importante nos fluxos de energia e nutrientes, uma vez que constituem uma porção significativa da biomassa animal.

As formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, sendo agrupadas em uma só família, Formicidae.

Estima-se que o número de gêneros possa ultrapassar 350 e o de espécies 20.000 (Hölldobler e Wilson 1990, Bolton 1994, Brown-Jr 2000), das quais 11.946 já foram descritas (Agosti e Johnson 2007). No Brasil, estão catalogadas mais de 2.000 espécies (Bueno e Campos-Farinha 1998).

A subfamília Ponerinae é considerada uma das mais primitivas da região neotropical, tanto pela sua morfologia quanto pelo seu comportamento e organização social. Distribuem-se pelo mundo inteiro, porém, são mais abundantes nas regiões tropicais. As formigas desta subfamília são, geralmente, predadoras e possuem ferrão funcional, com o qual submetem as presas (Caetano et al. 2002), particularmente insetos. Não perdem o ferrão após utilizá-lo em um animal, de forma que a glândula de veneno torna-se instrumento essencial para a sobrevivência dessas espécies (Ortiz e Mathias 2006), permitindo que as operárias forrageiem solitariamente (Hölldobler e Wilson 1990). Nesse grupo, são encontradas as maiores formigas do mundo.

O gênero *Dinoponera* apresenta seis espécies, todas com distribuição pela América do Sul (Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica) e, recentemente, formigas pertencentes a esse gênero foram classificadas, oficialmente, como espécie em perigo de extinção (Ministério do Meio Ambiente 2005).

*Dinoponera australis*, *Dinoponera grandis* e *Dinoponera gigantea* (falsas tocandiras), juntamente com outra espécie dessa subfamília, *Paraponera clavata* (verdadeira tocandira), apresentam importância médica e cultural. As verdadeiras

tocandiras são utilizadas em rituais de passagem para a idade adulta em Sateré-Mawé, uma tribo de 7000 índios que vive na fronteira do Pará com Amazonas (Haddad Junior et al. 2005).

As espécies desse gênero apresentam grande interesse científico face à ausência de rainha e presença de um espécime responsável pelas desovas. Nos últimos anos, aspectos da ecologia, comportamento e biologia reprodutiva, principalmente de *D. australis*, tornaram-se conhecidos (Freitas e Molina 2000). A perda da casta de rainhas é possível em espécies com pouco dimorfismo entre as castas de rainhas e operárias. A espermateca das operárias dessa espécie são funcionais, o que é incomum na maioria das formigas. Essas operárias têm a habilidade de se acasalar e botar ovos diplóides. Apenas algumas, de cada colônia, são sexualmente ativas, sendo que conflitos reprodutivos são intensos nessas sociedades (Monnin e Peeters 1998).

Embora fáceis de serem reconhecidas no campo, devido ao seu tamanho que pode chegar a três centímetros (Figura 1), poucos estudos sobre a ecologia, comportamento ou qualquer outro aspecto da biologia dessas espécies têm sido realizados. Morgan (1993) estudou vários aspectos de forrageamento, alimentação e comportamento de nidificação de *Dinoponera longipes*. Em 2004, Mariano et al. reportaram o cariótipo de *Dinoponera lucida* com  $2n = 106$  cromossomos, representando a espécie de maior número de cromossomos dentre os himenópteros já estudados.



**Figura 1:** Operária de *Dinoponera australis*.

O tamanho médio da colônia varia de 14 operárias em *D. australis* (Paiva e Brandão 1995, citado por Monnin e Ratnieks 2001) a 80 em *Dinoponera quadriceps* (Monnin e Peeters 1999). Os ninhos ocorrem no solo, apresentando 50-120 cm de profundidade em *D. australis* e *D. quadriceps* e 40 cm em *D. gigantea* (Fourcassié e Oliveira 2002).

## **Glândula de 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 veneno passa ativamente (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 e Ruppert 1996). Nestes, a glândula de veneno é uma estrutura localizada no último segmento do corpo e pode ter derivado filogeneticamente de glândulas ectodérmicas do ovipositor, sendo que em algumas espécies o ferrão é uma ferramenta importante na oviposição (Maschwitz e Kloft 1971).

Os insetos utilizam seu veneno como um fator que auxilia 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 conhecimento das propriedades dessas toxinas é de grande importância no estudo de mecanismos biológicos, bem como de propriedades terapêuticas (Lewis e Garcia 2003). Peptídeos, alcalóides sintéticos e fragmentos de peptídeos têm sido isolados de diversos animais a fim de testar a propriedade antimicrobiana destes compostos (Corzo et al. 2002; Haeberli et al. 2000; Jouvenaz et al. 1972 ; Li et al. 2000; Mendes et al. 2004; Subbalakshmi et al. 1999).

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).



O estudo da composição protéica do veneno de himenópteros é de grande interesse, por desencadear reações alérgicas em humanos (Hoffman 1996) e por fornecer informações importantes sobre a função de suas biomoléculas (Piek 1986). Além disso, os resultados dessas análises podem ser usados como um parâmetro alternativo para organizar e assegurar a designação própria de um determinado táxon bem como para estimar as relações de parentesco entre os diferentes táxons dos insetos (Leluk et al. 1989).

Os estudos mais extensivos da caracterização de veneno, dentre os himenópteros, são os 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).

Em Apidae, o veneno desempenha importante papel na defesa da colônia, possuindo 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 naturais e sintéticas e no entendimento de mecanismos antiinflamatórios (Banks e Shipolini 1986).

O veneno de vespas sociais (família Vespidae) geralmente causa dor, edema e eritema. Embora menos freqüente, as reações alérgicas em suas vítimas podem ser tão sérias como aquelas causadas pelo veneno de abelhas (Mueller et al. 1981 citado por Lima e Brochetto-Braga 2003).

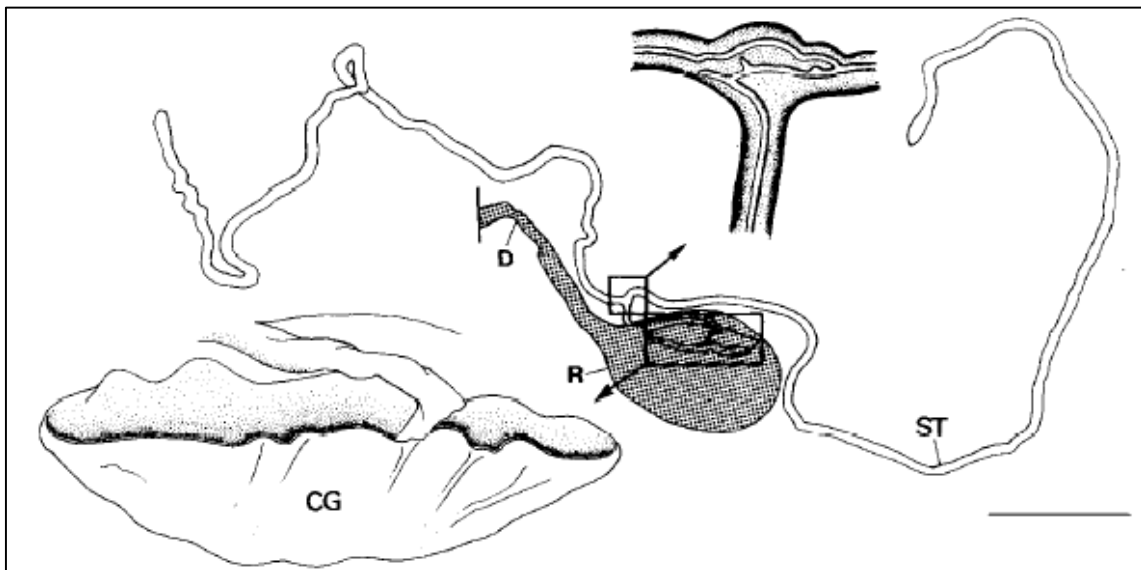
Em relação ao grupo das formigas, o veneno possui três principais funções: defesa (contra predadores), ofensiva (captura de presa) e comunicação social (Schimdt 1986). O conhecimento da composição e das propriedades do veneno ainda é muito limitado. Há certa dificuldade na obtenção de amostras suficientes para análise química. Além disso, a composição do veneno pode variar muito entre as diferentes subfamílias e mesmo entre as espécies, o que também dificulta qualquer conclusão sobre o assunto (Edstrom 1992).

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 constituída de mistura simples de ácidos orgânicos,

enquanto que o das subfamílias Ponerinae e Myrmicinae é uma mistura complexa de proteínas e neurotoxinas. As enzimas encontradas são as mesmas que ocorrem nos outros himenópteros (Edstrom 1992).

Pan e Hink (2000) demonstraram a propriedade antiinflamatória do veneno de *Pseudomyrmex triplarinus*. Foi observado que a mirmexina, um complexo de proteínas presente no veneno desta formiga, possui ação inibitória contra edema induzido em patas de camundongos.

Morfologicamente, a glândula de veneno (Figura 2) é descrita para a maioria dos insetos como consistindo de dois tubos cilíndricos, mais ou menos alongados e com convoluções, ligados em suas bases e com suas extremidades terminando em fundo cego (Ortiz e Mathias 2006).



**Figura 2:** Diagrama da anatomia da glândula de veneno de *Dinoponera australis*. Túbulos de secreção (ST), reservatório de veneno (R), glândula com convoluções (CG) e ducto de veneno (D). Escala da barra (para a glândula de veneno inteira) = 2 milímetros (Schoeters e Billen 1995).

---

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

Agosti, D., Johnson, NF., 2007. Antbase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <<http://www.antbase.org>>, version (05/2005). Acessado em: 03 jan. 2007.

Banks, BEC., Shipolini, RA., 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, RD., Ruppert, EE., 1996. Zoologia dos Invertebrados. Editora Roca. São Paulo, 1029 p.

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

Bolton, B., 1994. Identification guide to the ant genera of the world. Harvard University Press, 222 p.

Brown-Jr WL., 2000. Diversity of ants. In: Agosti, D., Majer, JD., Alonso, LE., Schultz, TR., (Eds). Standard methods for measuring and monitoring biodiversity, Smithsonian Institution Press, pp. 45-79.

Bueno, OC., Campos-Farinha AE., 1998. Comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. Vetores e Pragas 2, 13-6.

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

Corzo, G., Villegas, E., Gómez-Lagunas, F., Possani, LD., Belokoneva, OS., Nakajima, T., 2002. Oxyopinins, large anaphipathic 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.

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

Fourcassié, V., Oliveira, P., 2002. Foraging ecology of the giant ant *Dinoponera gigantea* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae): activity schedule, diet, and spatial foraging patterns. J Nat Hist. 36,2211–2227.

Freitas, JS., Molina, FB., 2000. Preliminary observations on prey consumption and feeding behavior of *Dinoponera australis* and *D. gigantea* at São Paulo Zoo (Hymenoptera, Formicidae). Arq.Inst.Biol. 67,1-145.

Haddad Junior, V., Cardoso, JLC., Moraes, RHP., 2005. Description of an injury in a human caused by a false tocamira (*Dinoponera gigantea*, 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.

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.

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

Hölldobler, B., Wilson, EO., 1990. The ants. Massachusetts: Belknap – Harvard, 732 p.

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

Jouvenaz, DP., Blum, MS., 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, RJ., Garcia, ML., 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2, 790-802.

Li, ML., Liao, RW., Qiu, JW., Wang, ZJ., Wu, TM., 2000. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparam M. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 13, 203-208.

Lima, PRM., 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, CSF., Delabie, JHC., Ramos, LS., Lacau, S., Pompolo, SG., 2004. *Dinoponera lúcida* Emery (Formicidae: Ponerinae): the highest number of chromosomes known in Hymenoptera. *Naturwissenschaften*. 91, 182-185.

Maschwitz, UWJ., Kloft W., 1971. Morphology and function of the venom apparatus of insects - bees, wasps, ants, and caterpillars. In: Buckley, EE., Bücherl, W., (eds). *Venomous Animals and Their Venoms*. Academic Press. New York. vol. 3, pp. 1-56.

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, MA., Souza, BM., Marques, MR., Palma, MS., 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.

Monnin, T., Ratnieks, FLW., 2001. Policing in queenless ponerine ants. *Behav Ecol Sociobiol*. 50, 97–108.

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

Mueller, U., Reisman, R., Wypych, J., Elliot, W., Steger, R., Walsh, S., Arbesman, C., 1981. Comparison of vespide venoms collected by electrostimulation and by venom sac extraction. *J. Allergy Clin. Immunol*. 98, 254-261.

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

Orivel, J., Redeker, V., Caer, JP., 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., Mathias, MIC., 2006. Venom gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae). Ultrastructural characterization. Micron 37, 243-248.

Paiva, RVS., Brandão, CRF., 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

Pan, J., Hink, WF., 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.

Piek, T., 1986. Venoms of bumble-bees and carpenter-bees In: Piek, T. Venoms of the Hymenoptera. Academic Press. New York, pp. 417.

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

Schoeters, E., Billen, J., 1995. Morphology and ultrastructure of the convoluted gland in the ant *Dinoponera australis* (Hymenoptera : Formicidae). Insect Morphol. & Embryo. 24 (3), 323-332.

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.



---

---

## **CAPÍTULO 2**

---

---

**IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES AO  
VENENO DE *Dinoponera australis* (Hymenoptera,  
Formicidae, Ponerinae) POR *PHAGE DISPLAY***

## RESUMO

O gênero *Dinoponera* apresenta seis espécies, todas com distribuição pela América do Sul, sendo que a *Dinoponera australis* é encontrada do Mato Grosso até o Rio Grande do Sul e países vizinhos. 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 ligantes específicos ao veneno de *D. australis* por *Phage Display*, (b) testar a inibição da atividade hemolítica pelos fagos selecionados conjugados com o veneno, (c) analisar a atividade nucleásica do veneno e (d) demonstrar se as partículas de fago são inativadas pelo veneno. Duas bibliotecas comerciais de peptídeos randômicos foram utilizadas: *Ph.D.-7 Heptapeptide Phage Display Library* e *Ph.D.-12 Peptide 12-mer Phage Display Library*. Após três etapas de seleção, 96 clones tiveram sua seqüência de DNA determinada e foram traduzidos, gerando 40 seqüências válidas e 21 peptídeos distintos. As análises de bioinformática identificaram 3 pequenos motivos proteicos: KVVxL, WxLL e KLxTIPM. A análise de similaridade encontrou como prováveis alvos em Humanos receptores celulares, fatores de transcrição, proteínas relacionadas a processos inflamatórios, canal de cálcio e receptor de proteína G. Já em insetos, a análise apontou como possíveis alvos canal de potássio, citocromo, ATPase, fator de transcrição e proteinase. O teste da atividade hemolítica dos fagos selecionados conjugados com veneno foram todos positivos demonstrando que nenhum dos nove peptídeos testados foi capaz de influenciar na ação do veneno. O teste de atividade nucleásica mostrou que nas concentrações de 2,5µg de veneno obteve-se um rastro que indica uma possível degradação do DNA. A concentração de 10µg de veneno bruto não foi capaz de inativar as partículas de fago. Tivemos sucesso na identificação de peptídeos de interesse, ligantes específicos ao veneno de *D. australis* por *Phage Display*, os quais podem ser moléculas alvo importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

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

## ABSTRACT

The genus *Dinoponera* is represented by six species, geographically distributed along South América. The species *Dinoponera australis* is found from Mato Grosso to Rio Grande do Sul, as well as in neighboring countries. These ants are characterized by the presence of venom glands that are responsible for the production of a toxin constituted in its majority by proteins. This investigation aimed: (a) the identification of specific ligand peptides to the *D. australis* venom through phage display, (b) to test the hemolytic activity inhibition by selected phages conjugated to the toxin, (c) to analyse the nucleolytic activity of the venom, and (d) to demonstrate if phage particles are inactivated by the venom. Two commercial random peptide libraries were used: *Ph.D.-7 Heptapeptide Phage Display Library* and *Ph.D.-12 Peptide 12-mer Phage Display Library*. After three rounds of selection, 96 phage clones were sequenced and translated, generating 40 valid sequences, and 21 distinct peptides. Bioinformatic analyses have identified three small frequent motifs: KVWxL, WxLL and KLxTIPM. Similarity tests have found as putative human cellular targets acting as: receptors, transcription factors, proteins associated with inflammation processes, calcium channel and G protein receptor. In insects, the closest identities found with putative targets were: potassium channel, cytochrome P450, ATPase, transcription factors, and proteinase. The hemolytic activity assays with selected phages conjugated with the venom were all positives, meaning that none of the peptides were able to influence the toxin activity. The nucleolytic activity assay with venom concentrations equal to 2.5 µg was shown by a smeared DNA profile in agarose gel electrophoresis, which may indicate a possible DNA degradation. The crude venom concentration of 10 µg was not able to inactivate phage particles. We have successfully identified interesting peptides that bind specifically to the *D. australis* venom through *Phage Display*, which may be important target molecules for the development of therapeutic strategies.

**Key words:** Phage Display, venom, *Dinoponera australis*.

## Introdução

*Dinoponera* representa um grupo notável e convergente da subfamília Ponerinae. As espécies desse gênero não apresentam fêmea reprodutiva distinguível e a reprodução ser garantida por operárias fertilizadas denominadas *gamergates* (Monnin e Peeters 1998). Apresenta seis espécies, todas com distribuição pela América do Sul (Freitas e Molina 2000).

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

As formigas utilizam seu veneno na defesa contra predadores, captura de presas e comunicação social (Schimdt 1986). 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).

Biblioteca de peptídeos sintéticos apresentados em fagos é uma ferramenta importante para identificar os sítios ligantes de moléculas biológicas de interesse. É um método de seleção no qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma viral (Azzazy e Highsmith 2002).

Smith (1985) foi pioneiro ao conseguir a expressão da enzima de restrição *EcoRI* como uma fusão da proteína três (pIII) do capsídeo do fago. Tipicamente, utiliza-se o bacteriófago M13 (Sidhu 2001), um vírus bacteriófago filamentoso que parasita bactérias Gram-negativas que por sua vez apresentam pilus F. O vírus utiliza maquinária 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).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) . Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (Phizicky e Fields 1995; Brígido e Maranhão 2002).

A apresentação do peptídeo pelo fago é possível, pois, nesse sistema, seqüências aleatórias de DNA são introduzidas no gene que codifica a proteína do capsídeo do fago (camada externa e protetora). Desta forma, seqüências aleatórias de peptídeos fundidas à proteína do capsídeo (pIII ou pVIII, dependendo do sistema a ser empregado) são geradas durante a produção da partícula viral (Smith 1985). No fim do processo, bilhões de bacteriófagos são gerados, cada um deles apresentando um peptídeo diferente. Esta coleção de partículas virais recebe o nome de biblioteca apresentadora de peptídeos. Estas bibliotecas são, então, incubadas com as moléculas alvos do estudo (receptores purificados, células expressando seus receptores de superfície, anticorpos, entre outros). Este processo denominado *biopanning*, ou simplesmente *panning*, permite selecionar os fagos ligantes, expressando os peptídeos que mimetizam ligantes naturais destas moléculas (Barbas et al. 2001).

A tecnologia de *Phage Display* tem apresentado grande impacto na imunologia, biologia celular, descoberta de medicamentos e outros fármacos (Willats 2002).

O presente trabalho teve como objetivos identificar peptídeos ligantes ao veneno de *D. australis* por *Phage Display*, testar a capacidade de inibição da atividade hemolítica dos fagos selecionados conjugados com o veneno, bem como analisar a atividade nucleásica e a capacidade do veneno de *D. australis* de inativar partículas de fagos.

## Material e Métodos

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

## Material Biológico

Foram utilizadas formigas *D. australis* (Figura 1) capturadas quando forrageavam nas proximidades de ninhos localizados no *Campus* Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG – S 18° 55'; W-GR 48° 17'). Após a captura, os indivíduos foram levados ao laboratório para manipulação experimental.



**Figura 1:** Operária de *D. australis* carregando sua presa.

## Extração do veneno

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

## Seleção de fagos ligantes ao veneno

Para a seleção dos fagos foi utilizada uma placa de microtitulação (NUNC maxisorp<sup>rt</sup> Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, USA), onde um orifício foi sensibilizado com 10 µg de veneno bruto em Tampão (NaHCO<sub>3</sub> 0.1M pH 8.6). A placa foi agitada gentilmente em câmara úmida por 12 h a 4° C e, em seguida, o excesso de proteínas foi descartado batendo a placa em papel toalha. Ao final da sensibilização, a placa foi bloqueada com Tampão (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M pH 8,6; 5 mg/mL BSA e NaN<sub>3</sub> 0,02 g.100 mL<sup>-1</sup>) por 1 h a 4° C. Terminado o bloqueio a placa foi lavada por seis vezes em tampão TBS 1X contendo 0,1 g.100 mL<sup>-1</sup> de TWEEN 20 (TBST) e incubada por 1h com 2 x 10<sup>10</sup> partículas de fagos por poço, oriundos das bibliotecas de peptídeos expressos em fagos M13, previamente diluídos em tampão PBS.

Utilizou-se uma mistura de duas bibliotecas: *Ph.D.-7 Heptapeptide Phage Display Library* (complexidade: 2,8 x 10<sup>9</sup> transformantes) e *Ph.D.-12 Peptide 12-mer Phage Display Library* (complexidade: 2,7 x 10<sup>9</sup> transformantes) Peptide Library Kits (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA).

Os fagos não ligantes foram removidos lavando 10 vezes com tampão TBST 0,1 g.100 mL<sup>-1</sup> na primeira etapa e 0,5 g.100 mL<sup>-1</sup> nos seguintes e eluídos com 50 mM de Tampão Glicina (pH 2.2).

A concentração de Tween 20 foi aumentada (de 0,1 g.100 mL<sup>-1</sup> para 0.5 g.100 mL<sup>-1</sup>) para elevar a estringência do processo e para garantir a seleção de fagos altamente específicos. Mudou-se o pH do meio para 2.2, o que provoca uma mudança na estrutura de proteínas e, conseqüentemente, um rompimento da interação peptídeo-proteína.

Os fagos recuperados foram amplificados em *Escherichia coli* ER2738, que é uma cepa que apresenta pilus sexual. A seleção foi repetida mais duas vezes usando sempre o eluato anterior a etapa em questão como representante da biblioteca de fagos.

## Titulação

A titulação é um procedimento necessário para determinar o número de partículas virais que serão incorporadas ao próximo passo do *biopanning*.

Bactéria ER2738 não infectada foi cultivada sob vigorosa agitação à 37° C até DO<sub>600</sub> ~ 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<sub>2</sub> e 0,21 g de agarose) em tubo Falcon (1 para cada diluição) e os tubos foram mantidos em banho-maria a 60°C. Em seguida foi feita a diluição colocando 9 µL de meio LB (sem bactéria) em 8 microtubos e 1 µL da suspensão de fago no primeiro microtubo. Posteriormente, 1 µL do primeiro microtubo foi transferido para o segundo, 1 µL do segundo transferido para o terceiro e assim por diante. Feito a diluição, foram acrescentados 200 µL de meio com bactéria em cada microtubo e incubado por 5 min em temperatura ambiente. O conteúdo de cada microtubo contendo a diluição foi transferidos para o tubo Falcon contendo 3 ml de Agarose Top, misturando rapidamente e vertendo em placa o meio LB sólido contendo IPTG/X-gal. As placas foram incubadas a 37° C por 12 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 hidroliza o X-gal, transformando os subprodutos em uma coloração azulada, indicando as colônias azuis que estão infectadas pelo vírus.



Deste modo, 96 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.

### **Amplificação de fagos em *Deepwell***

Inoculou-se amostras de células coletadas de uma única colônia de ER2738 em 20 mL de meio LB, incubada sob agitação a 37° C por 16 h. Em 120 mL de meio LB (autoclavado e com tetraciclina-1 µL/1 mL) diluiu-se 1 mL da cultura anterior. Em cada poço (um para cada clone a ser caracterizado) da *deepwell* dispensou-se 1 mL da cultura diluída.

Usando palitos de madeira esterilizados, retirou-se colônias azuis da placa de *Petri* (eluato do 3° ciclo) e transferiu-se para um poço da *deepwell* contendo cultura diluída. É importante retirar colônias de placas que contenham não mais de 100 colônias aproximadamente, o que assegura que cada colônia contém uma única seqüência de DNA.

A placa *deepwell* foi vedada com um adesivo próprio e incubada, por 5 h a 37° C. Retirou-se 100 µL de cada poço transferindo para uma placa de microtitulação *Corning Incorporated Costar*® 3591, como um *backup*. Incubou-se a *deepwell* nas mesmas condições anteriores por mais 8 h.

Centrifugou-se a placa *deepwell* por 20 min a 3700 rpm, transferindo seu conteúdo para uma outra *deepwell* estéril, por pipetagem, coletando o máximo de sobrenadante possível. Adicionou-se 1/6 do volume em PEG/NaCl incubando-a por mais 16h a 4° C. Centrifugou-se por 1 h a 3700 rpm. Verteu-se a *deepwell* dispensando todo o sobrenadante, secando sobre papel-toalha, que foi trocado várias vezes para evitar contaminação cruzada, e ressuspendeu-se o precipitado em 200 µL de tampão PBS 1X.

### **Extração de DNA de fago em placa *deepwell***

Os fagos foram crescidos em placas *deepwell* (1 mL de meio LB por poço) por 24 h. A placa foi centrifugada por 20 min a 3700 rpm. Foram pipetados 800 µL 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 min a 3700 rpm a 4° C e em seguida invertida em papel absorvente. O *pellet* foi dissolvido em 100 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, 1mM 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 40 min a 20° C 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 dissolvido em 20 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura. A qualidade e quantidade do DNA viral foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

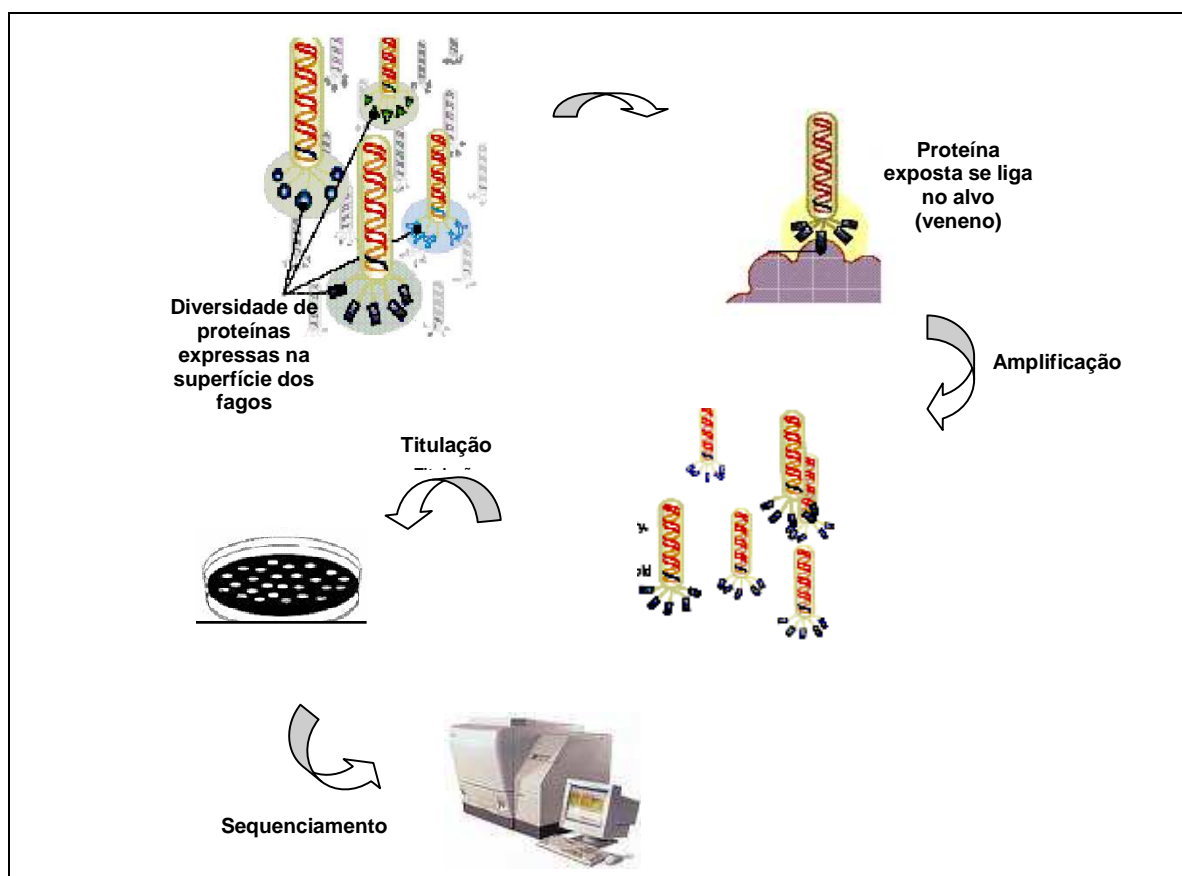
### **Determinação das Seqüências de DNA**

Para determinação da seqüência de DNA foram utilizados 500 ng de DNA molde, 5 pmol do primer -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (ETDye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences). A reação de 30 ciclos foi realizada em Termociclador de Placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (95° C por 20 seg); anelamento do primer (58° C por 15 seg) e extensão (60° C por 1 min). 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 submetida à centrifugação a 800 rpm durante 1 seg. A placa foi coberta com

papel alumínio, permanecendo por 5 min para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos no Tampão de Diluição (ETDye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences).

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

A Figura 2 mostra o esquema da seleção de fagos ligantes ao veneno de *D. australis*.



**Figura 2:** Esquema da seleção de fagos ligantes ao veneno de *D. australis*.

## Bioinformática

Após a determinação das seqüências de DNA, as mesmas foram traduzidas pelo programa DNA2PRO12. Este programa é designado para tradução de

seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs (Ph.D.-12<sup>TM</sup> or Ph.D.-7<sup>TM</sup>)* 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>)).

Para o cálculo da diversidade e derivação padrão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos foi empregado o programa DIVAA (<http://relic.bio.anl.gov/divaa.aspx>). O cálculo da freqüência e da diversidade de aminoácidos dentro da população de peptídeos foi realizado pelo programa AAFREQ (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>).

A análise de similaridade dos peptídeos com proteínas de Insetos, *Homo sapiens* e *Escherichia coli* foi feita utilizando-se o banco BLAST *search for short, nearly exact matches* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Neste trabalho foram utilizadas apenas as proteínas com mais de 90% de identidade.

As similaridades entre os 21 peptídeos selecionados, foram determinadas utilizando o programa CLUSTAL W versão 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), que inclui ainda na análise o pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados.

Para análise de prováveis motivos existentes entre os peptídeos utilizou-se o programa MOTIF2 (<https://relic.bio.anl.gov/motif2.aspx>).

### ***Dot-blotting***

Em membranas de nitrocelulose (Hybond ECL – GE Healthcare) com poros de 0,45 µm, foram adicionados 20 µg de veneno bruto. Após secagem das amostras, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão TBST 0,5 g.100 mL<sup>-1</sup> por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, o bloqueio foi trocado, adicionando-se 4 x 10<sup>11</sup> fagos (clones Dino1 a Dino8) e incubando as membranas por 12 h. Posteriormente, as membranas

foram lavadas 6 vezes com TBST 0,5 g.100 mL<sup>-1</sup> e incubadas por 1 h com anti-M13 (Biolabs) não marcado, diluído na proporção de 1:5000 em solução de bloqueio. Após ligação do anticorpo anti-M13, a membrana foi lavada 6 vezes com tampão TBST 0,5 g.100 mL<sup>-1</sup> e incubada com anticorpo anti-comundongo (Sigma) conjugado com Fosfatase Alcalina, diluído em 1:5000, por 1 h. Após 6 lavagens consecutivas com tampão TBST 0,5 g.100 mL<sup>-1</sup>, as membranas foram reveladas com os substratos NBT/BCIP à temperatura ambiente. A revelação foi interrompida com lavagens da membrana em água destilada. Todos os processos de incubação foram realizados à temperatura ambiente. Como Controle negativo utilizou-se o fago selvagem (Helper), que não apresenta nenhum peptídeo conjugado.

Para a realização do *Dot-blotting* foram escolhidos oito clones, identificados como Dino1 a Dino8, conforme descritos posteriormente nos resultados. O clone Dino 1 foi escolhido por apresentar a maior frequência, o clone Dino7 por apresentar o maior grau de informação e os outros clones foram escolhidos aleatoriamente.

### **Atividade Hemolítica**

Foram colocados 78 mL do Meio Ágar Sangue Humano preparado de acordo com protocolo de Géis para Hemólise Radial (Gutiérrez et al. 1988) em placa de *Petri* nivelada. Após a gelificação do meio foram abertos poros de 10 mm para aplicação das amostras conforme Tabela 1. O Controle consistiu na aplicação de 13 µl solução Tampão (PBS). Após a aplicação das amostras, as placas permaneceram em estufa a 37° C por 12 h. A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos formados com auxílio de paquímetro digital (Digimess).

Para a realização do teste de atividade hemolítica foram utilizados os mesmo clones escolhidos para a realização da análise por *dot-blotting*.

**Tabela 1:** Amostras e respectivas quantidades utilizadas no teste de atividade hemolítica. **C:** Controle (Tampão PBS sem veneno); **V<sub>1</sub>:** veneno bruto; **F: Fago; Dino1 – Dino8:** clones escolhidos aleatoriamente incubados com veneno.

Amostras		Quantidade	
<b>C</b>	Controle	13µL	-----
<b>V<sub>1</sub></b>	Veneno	3µL	3µg
<b>F</b>	Fago	10µL	10 <sup>11</sup>
<b>Dino1</b>	Fago Dino1 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg
<b>Dino2</b>	Fago Dino2 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg
<b>Dino3</b>	Fago Dino3 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg
<b>Dino4</b>	Fago Dino4 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg
<b>Dino5</b>	Fago Dino5 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg
<b>Dino6</b>	Fago Dino6 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg
<b>Dino7</b>	Fago Dino7 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg
<b>Dino8</b>	Fago Dino8 + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg

### Atividade Nucleásica

Para a realização do teste de atividade nucleásica foi utilizado DNA extraído do fago M13 submetido à diferentes concentrações de veneno bruto (10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg e 0,75 µg). Cada amostra de veneno foi incubada por 30 min com 200 ng de DNA. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 g.100 mL<sup>-1</sup>, que foi imediatamente submetido à eletroforese submersa (2 h, 150V).

### **Teste para inativação de partículas de fagos pelo veneno de *D. australis***

Neste teste, a titulação foi realizada para testar a capacidade de inativação das partículas de fagos pelo veneno de *D. australis*. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, foram tituladas somente partículas do fago M13 na ausência de veneno, que serviu de Controle. No segundo ensaio, chamado de “Experimento Teste”, 10 µg de veneno bruto (mesma concentração utilizada no *biopanning*) foram incubados por 30 min com  $10^{10}$  partículas do fago M13. Posteriormente, foram adicionados 50 mM de Tampão Glicina (pH 2.2), o que provoca uma mudança na estrutura de proteínas e, conseqüentemente, um rompimento da interação peptídeo-proteína.

A bactéria ER2738 foi crescida até  $DO_{600} \sim 0,5$  em 10 mL de meio LB. Foram feitas alíquotas de 3 mL de Agorose Top (0,6 g de LB, 0,03 g de  $MgCl_2$  e 0,21 g de agarose) em tubo Falcon (1 para cada diluição) e os tubos foram mantidos em banho-maria a 60°C. Em seguida foi feita a diluição colocando 9 µL de meio LB (sem bactéria) em microtubos juntamente com 1 µL da amostra (fago ou fago incubado com veneno) no primeiro tubo. Posteriormente, 1 µL do primeiro tubo foi transferido para o segundo e assim por diante. Feito a diluição, foram acrescentados 200 µL de meio com bactéria em cada microtubo e incubado por 5 min em temperatura ambiente. O conteúdo de cada microtubo contendo a diluição foi transferidos para o tubo Falcon contendo 3 ml de Agorose Top, misturando rapidamente e vertendo em placa o meio LB sólido contendo IPTG/X-gal. As placas foram incubadas 37°C por 12 h e o número de colônias azuis foram contadas e comparadas nos experimentos Controle e Teste.

## Resultados e Discussão

Este trabalho é pioneiro no estudo do veneno de *D. australis*. Até o momento, poucas são as informações disponíveis sobre esta formiga e este estudo vem contribuir para o conhecimento de alguns aspectos de seu veneno. Para tal, foi utilizado a técnica de *Phage Display* com o objetivo de buscar os prováveis alvos do veneno, tanto em humanos, devido a importância terapêutica, como em outros insetos. Portanto, este estudo ganha importância científica por buscar estudar um organismo ainda pouco explorado e por se tratar da primeira vez que se faz um *biopanning* no veneno desta formiga.

### **Biopanning – Seleção de peptídeos**

As titulações realizadas foram eficientes em todos os ciclos de seleção de peptídeos. No final de cada ciclo de seleção o eluato (fagos ligados às proteínas do veneno) e o amplificado foram titulados (Tabela 2). Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade às proteínas do veneno ficam ligados a este pela interação peptídeo-proteína e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade são lavados (removidos). Nas ampliações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

**Tabela 2:** Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a proteínas do veneno de *D. australis*. Título obtido (pfu) no processo de *biopanning*.

Ciclos	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1º Ciclo de seleção	$1,5 \times 10^{11}$	$4,6 \times 10^4$
2º Ciclo de seleção	$2,4 \times 10^{11}$	$7,0 \times 10^3$
3º Ciclo de seleção	$4,9 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^4$



Observa-se na Tabela 2 uma queda esperada no número de partículas virais selecionadas no segundo ciclo de seleção ( $7,0 \times 10^3$  pfu), pois a partir dessa etapa a estringência de seleção foi elevada pelo aumento da concentração de Tween 20 de  $0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  para  $0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  no tampão de lavagem. Esse detergente é classificado como não iônico e tem por finalidade impedir ligações inespecíficas, aumentando a eficiência de seleção de fagos específicos de proteínas do veneno de *D.australis*.

Durante 3 ciclos consecutivos de *biopanning* todas as colônias presentes nas placas de titulação apresentaram coloração azulada, indicando a quebra do substrato X-Gal pela  $\beta$ -galactosidase, induzida pelo IPTG presente nos fagos, pelas bactérias ER2738.

### **Determinação das Sequências de DNA e Bioinformática**

Após a terceira etapa de seleção foi realizada a extração do DNA dos fagos. A análise eletroforética obtida mostrou ausência de degradação e de contaminantes, permitindo a determinação da seqüência de 96 clones (dado não mostrado).

O programa DNA2PRO12, utilizado para traduzir as seqüências, forneceu 40 peptídeos, dos quais foram identificadas 21 seqüências diferentes.

A Tabela 3 apresenta alguns parâmetros utilizados para indicação do sucesso de seleção de cada peptídeo, conforme Rodi et al. (2002). Nesta Tabela são apresentadas as seqüências dos peptídeos selecionados após a terceira etapa de seleção, separados de acordo com a biblioteca utilizada (Ph.D.-12 ou Ph.D.-7), a amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada (FE) dos peptídeos na biblioteca original, o número provável de clones independentes dentro da biblioteca ( $\lambda$ ) e o grau de informação de cada peptídeo, que foi calculado utilizando o log neperiano da probabilidade de ocorrência ao acaso do fago na biblioteca. Quanto maior o grau de informação,

melhor o peptídeo, ou seja, a seleção foi mais efetiva e, mais raro ele é na biblioteca.

**Tabela 3:** Seqüência de aminoácidos, respectivos clones, freqüência observada, freqüência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO)	Frequência Randômica* (FE)	Amplificação (FO/FE)	I(m)**	$\lambda$ ***
<b>Ph.D.-12</b>						
Dino1	KVWNLLPPPIVR	10/40(25,0%)	$1,62 \cdot 10^{-17}$	$1,54 \cdot 10^{16}$	38,66	$3,24 \cdot 10^{-8}$
Dino2	QFPPHSPHAPPA	1/40 (2,5%)	$4,52 \cdot 10^{-19}$	$5,52 \cdot 10^{16}$	42,24	$9,04 \cdot 10^{-10}$
Dino3	HSLKNSMLTVMA	1/40 (2,5%)	$1,28 \cdot 10^{-13}$	$1,93 \cdot 10^{11}$	29,68	$2,57 \cdot 10^{-4}$
Dino4	FPPSQRTAFNDL	2/40 (5,0%)	$1,47 \cdot 10^{-19}$	$3,38 \cdot 10^{17}$	43,36	$2,95 \cdot 10^{-10}$
Dino5	TYHYPIWSKPNT	1/40 (2,5%)	$2,68 \cdot 10^{-14}$	$9,32 \cdot 10^{11}$	31,25	$5,36 \cdot 10^{-5}$
Dino6	HTLRVDNLHRPL	3/40 (7,5%)	$2,94 \cdot 10^{-12}$	$2,54 \cdot 10^{10}$	26,55	$5,89 \cdot 10^{-3}$
Dino7	AVPRLLTAMSSP	1/40 (2,5%)	$9,74 \cdot 10^{-22}$	$2,56 \cdot 10^{19}$	48,38	$1,94 \cdot 10^{-12}$
Dino8	YSLRADSRWMPS	1/40 (2,5%)	$6,36 \cdot 10^{-12}$	$3,92 \cdot 10^9$	25,78	$1,27 \cdot 10^{-2}$
Dino10	QPHKVFFPNLPR	1/40 (2,5%)	$4,30 \cdot 10^{-15}$	$5,81 \cdot 10^{12}$	33,08	$8,60 \cdot 10^{-6}$
Dino11	HSVKRDIVYTAS	3/40 (7,5%)	$3,47 \cdot 10^{-14}$	$2,15 \cdot 10^{12}$	30,99	$6,95 \cdot 10^{-5}$
Dino13	KAADTMKAYYHT	1/40 (2,5%)	$7,12 \cdot 10^{-13}$	$3,50 \cdot 10^{10}$	27,97	$1,42 \cdot 10^{-3}$
Dino14	KVWALPDQTPRP	1/40 (2,5%)	$9,93 \cdot 10^{-18}$	$2,51 \cdot 10^{15}$	39,15	$1,98 \cdot 10^{-8}$
Dino15	GNWWDLLWEVDL	1/40 (2,5%)	$1,99 \cdot 10^{-11}$	$1,25 \cdot 10^9$	24,64	$3,98 \cdot 10^{-2}$
Dino16	KVWTLDSKPPS	2/40 (5,0%)	$1,67 \cdot 10^{-14}$	$2,98 \cdot 10^{12}$	31,72	$3,35 \cdot 10^{-5}$
Dino17	SFNANTVYVNYL	1/40 (2,5%)	$1,01 \cdot 10^{-11}$	$2,45 \cdot 10^9$	25,31	$2,03 \cdot 10^{-2}$
Dino18	HHPTPYMSLSE	1/40 (2,5%)	$2,01 \cdot 10^{-16}$	$1,23 \cdot 10^{14}$	36,14	$4,03 \cdot 10^{-7}$
Dino22	NFLTQNFAPNHN	1/40 (2,5%)	$2,03 \cdot 10^{-15}$	$1,23 \cdot 10^{13}$	33,83	$4,06 \cdot 10^{-6}$
Dino25	ANWNYKFSFGAV	1/40 (2,5%)	$1,86 \cdot 10^{-13}$	$1,33 \cdot 10^{11}$	29,31	$3,73 \cdot 10^{-4}$
<b>Ph.D.-7</b>						
Dino34	KLWTIPM	2/40 (5,0%)	$5,31 \cdot 10^{-8}$	$9,40 \cdot 10^5$	16,75	$1,06 \cdot 10^2$
Dino36	KLRTIPM	4/40 (10,0%)	$7,41 \cdot 10^{-9}$	$1,34 \cdot 10^7$	18,72	$1,48 \cdot 10^1$
Dino40	KAWIIPA	1/40 (2,5%)	$2,07 \cdot 10^{-7}$	$1,20 \cdot 10^5$	15,39	$4,14 \cdot 10^2$

\*Probabilidade de seqüência randômica = freqüência esperada na biblioteca (FE)

\*\*I(m) = grau de informação =  $-\ln$  (probabilidade de seqüência randômica)

\*\*\*  $\lambda$  = número provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde complexidade da biblioteca ( $2 \times 10^9$ ).

Os dados apresentados na Tabela 3 indicam que o peptídeo KVWNLLPPPIVR foi o mais freqüente e o quinto com maior grau de informação. Isto faz com que este clone seja um dos principais mimotopos selecionados,

especialmente quando se considera o número de clones independentes dentro da biblioteca, com esta mesma seqüência, que eram esperados ( $3,24 \cdot 10^{-8}$ ). Ainda em relação a este parâmetro, foram encontrados números muito baixos na biblioteca de 12-mer, o que mostra a eficiência da seleção, pois mesmo com baixas probabilidades de se obter estes peptídeos, eles foram selecionados no *biopanning* realizado. Portanto, nota-se que houve um grande enriquecimento de todos os peptídeos selecionados em relação a sua freqüência esperada na biblioteca de fagos, sugerindo que os fagos são específicos para o veneno de *D. australis*.

O peptídeo AVPRLLTAMSSP foi o que apresentou o maior grau de informação (48,38). Peptídeos que exibem alto grau de informação são menos prováveis de ocorrer ao acaso do que aqueles que apresentam baixo nível de informação (Rodi et al. 2002).

Apesar do presente estudo ter utilizado, em conjunto, duas bibliotecas lineares (7 e 12-mer) de peptídeos recombinantes (New England Biolabs, Ph.D.-12<sup>TM</sup> or Ph.D.-7<sup>TM</sup>) durante os ciclos de seleção, apenas 3 peptídeos com 7 resíduos foram selecionados (Dino34, Dino36 e Dino40).

Du et al. (2006) utilizando, concomitantemente, as bibliotecas 12-mer e 7-mer detectaram apenas peptídeos com 12 aminoácidos e sugerem que a biblioteca de PhD-12 apresenta melhor capacidade de propagação. Uma possível explicação é a possibilidade das proteínas mimetizadas apresentarem epítomos ou motivos com mais de sete resíduos. Outra explicação é a maior probabilidade de se encontrar combinações de aminoácidos ou motivos protéicos favoráveis e com maior afinidade na biblioteca de 12 resíduos.

Freschi (2006) utilizando uma mistura de duas bibliotecas lineares (7 e 12-mer) e uma conformacional (9-mer) de peptídeos recombinantes, selecionou apenas um peptídeo com menos de 12 resíduos, não sendo possível isolar mais do que um epítomo conformacional com nove resíduos.

Adicionalmente, bibliotecas 12-mers são relativamente longas e capazes de se dobrar em elementos estruturais curtos que podem ser úteis quando a seleção

é feita contra alvos que requerem ligantes estruturados (New Englands Biolabs 2007).

O cálculo da freqüência de cada aminoácido nos peptídeos selecionados foi realizado pelo programa AAFREQ e está apresentado na Tabela 4. Os aminoácidos mais freqüentes foram alanina (A) estando presente 16 vezes, leucina (L) aparecendo 20 vezes, prolina (P) 27 vezes e serina (S) com freqüência de 19 vezes.

O fato das bibliotecas serem de peptídeos randômicos permite que vários clones possam compartilhar os mesmos motivos, mas com resíduos em posições diferentes do peptídeo, fazendo com que certos aminoácidos sejam mais freqüentes após a seleção e sequenciamento. Assim, a alta freqüência desses aminoácidos nas referidas posições do peptídeo recombinante, pode indicar um provável motivo não apresentado nos clones selecionados, mas descoberto pela combinação de várias seqüências (Santos 2006).

Na Tabela 4 foi encontrado um dos possíveis motivos consenso (KVWKLDFAFPPL) através dos aminoácidos que apresentaram maior freqüência. Este motivo foi utilizado nas subseqüentes análises de similaridade com outras proteínas. Em humanos os resultados demonstraram similaridade com fatores de transcrição (zinc-finger e fator nuclear), receptores de hormônios, Imunoglobulina IgE, receptores de IgE, receptor de prokinecitina, entre outros. Já em insetos, este motivo consenso mostrou similaridade com precursor de proteína amarela de *Drosophila* e phosphodiesterase 7A.

**Tabela 4:** Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados, a frequência observada e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AAFREQ. Em cinza estão marcados os aminoácidos mais frequentes. Em vermelho os aminoácidos que apresentaram seleção negativa e em verde seleção positiva.

AA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total	Frequência Observada (%)	Frequência Esperada (%)
A	2	1	1	2	1	0	0	4	1	0	2	2	16	7,4	6,2
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,1
D	0	0	0	1	1	4	1	0	0	0	2	0	9	4,2	3,1
E	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0,9	3,1
F	1	3	0	0	0	1	3	0	2	0	0	0	10	4,6	3,1
G	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0,9	6,2
H	4	1	2	0	1	0	0	1	1	0	2	0	12	5,6	3,1
I	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	3	1,4	3,1
K	4	0	0	3	0	1	1	0	2	0	0	0	11	5,1	3,1
L	0	0	4	0	4	3	1	2	0	2	0	4	20	9,3	9,4
M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	6	2,8	3,1
N	1	2	1	2	2	1	1	0	1	3	1	1	16	7,4	3,1
P	0	2	4	1	2	1	2	2	2	4	5	2	27	1,3	6,2
Q	2	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	5	2,3	6,2
R	0	0	0	3	1	1	0	1	0	1	1	2	10	4,7	9,4
S	1	3	0	1	0	2	2	3	1	1	2	3	19	8,8	9,4
T	1	1	0	3	1	1	2	0	2	1	0	2	14	6,5	6,2
V	0	4	1	0	2	0	1	1	1	2	1	1	14	6,5	6,2
W	0	0	5	1	0	0	1	1	1	0	0	0	9	4,2	3,1
Y	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1	1	0	11	5,1	3,1
													<b>Seqüência consenso</b>		
K V W K L D F A F P P L															

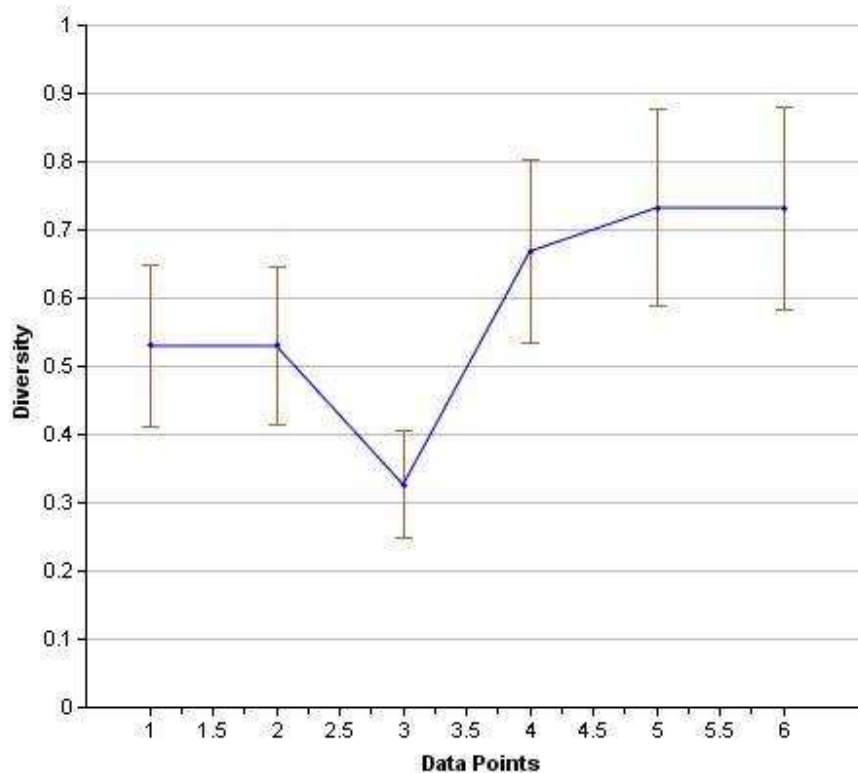
A Tabela 4 apresenta, também, a comparação entre a frequência dos vinte aminoácidos presentes na população de peptídeos ligantes e a frequência esperada dos aminoácidos na biblioteca original.

Observa-se que a seleção foi eficiente principalmente pelos aminoácidos cisteína (C), glutamato (E), glicina (G), prolina (P), glutamina (Q) e arginina (R), que foram selecionados negativamente, apresentando freqüência bem abaixo do esperado e pela seleção positiva dos aminoácidos histidina (H), lisina (K) e asparagina (N), que apresentaram freqüência acima do esperado.

Na população de peptídeos selecionados foi observada a ausência de resíduos de cisteína. Uma causa provável é a interferência no processo infectivo do fago na bactéria, pois, de acordo com Rodi et al. (2002), resíduos de cisteína não pareados (que não formam ponte dissulfeto) presentes no peptídeo recombinante podem formar pontes dissulfeto com os quatro resíduos de cisteína localizados no domínio D1 da pIII do fago e desta forma diminuir a infectividade do fago. Assim, peptídeos com cisteína são menos freqüentes na população selecionada, fato que compromete o mapeamento de epítomos e isolamento de mimetopos de proteínas ricas em cisteína. Os aminoácidos Arginina e Cisteína, que apresentaram seleção negativa neste estudo, atuam na secreção da proteína pIII e podem interferir na infectividade dos fagos. Conseqüentemente, clones com peptídeos contendo estes aminoácidos podem ser menos freqüentes durante a seleção (Noren e Noren 2001).

DIVAA é uma medida quantitativa de diversidade de sucessão dos aminoácidos e gera hipóteses relativas à contribuição de resíduos individuais para as relações funcionais e evolutivas entre proteínas.

A Figura 3 apresenta um gráfico gerado pelo programa DIVAA, que calcula a diversidade de aminoácidos em cada uma das 12 posições nos peptídeos e a derivação padrão, mostrando as posições onde ocorreu a maior diversidade de aminoácidos. Para a construção deste gráfico foram utilizados apenas peptídeos de 12 aminoácidos. O gráfico mostra que da posição 5 até a 6 houve a maior diversidade de aminoácidos, ultrapassando 0,7, enquanto que na posição 3 a diversidade foi reduzida, ficando abaixo de 0,3.



**Figura 3:** Gráfico gerado pelo programa DIVAA que mede a diversidade na sucessão dos 12 aminoácidos em cada posição nos peptídeos, sendo que cada 0,5 ponto representa um aminoácido e o primeiro aminoácido encontra-se no ponto 1.

O resultado da busca no banco de dados BLAST (*short, nearly exact matches*) é mostrada na Tabela 5 que, também, apresenta as seqüências dos peptídeos selecionados, o número de acesso e o provável alvo. Sabe-se que as formigas da subfamília Ponerinae são, geralmente, predadoras e possuem ferrão funcional, com o qual submetem as presas (Caetano et al. 2002), particularmente insetos. Devido a esta informação, a análise de similaridade com outras proteínas realizada pelo BLAST foi feita contra proteínas de insetos.

O estudo da composição protéica do veneno de himenópteros é de grande interesse, por desencadear reações alérgicas sérias em humanos (Hoffman 1996). As espécies de formiga do gênero *Dinoponera* pertencem a um grupo de formigas de interesse médico. Haddad Junior et al. (2005), relataram os aspectos clínicos do envenenamento pela *D. gigantea*, após acidente causado pela picada dessa formiga observando edema, eritema e dor excruciante. A evolução do envenenamento cursou com fenômenos sistêmicos imediatos, como sudorese fria, náuseas, vômitos, mal estar, taquicardia e linfadenopatia. Após 3 h, 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 arrefeceu em 8h, tendo permanecido por cerca de 24 h.

Com base nas informações anteriores, realizou-se o mesmo procedimento de busca por similaridade com proteínas de *Homo sapiens* e os prováveis alvos também são apresentados na Tabela 5.

O programa MOTIF2 identifica pequenos motivos descontínuos dentro da população de peptídeos. A Tabela 6 mostra alguns dos motivos encontrados e que apresentaram similaridade com outras proteínas no banco de dados BLAST. Nela estão apresentados as proteínas, o número de acesso e os prováveis alvos, tanto em humanos, devido aos acidentes causados por sua picada, quanto em insetos, por serem as prováveis presas da formiga *D. australis*.



**Tabela 5:** Análise de bioinformática dos peptídeos selecionados por *Phage Display* em veneno de *D. australis* contra proteínas de Humanos e Insetos.

Clones	Peptídeos	Acesso	Alvos potenciais em Humanos	Acesso	Alvos potenciais em Insetos
Dino1	KVWNLLPPPIVR	AAI13690	<b>Canal de cloro</b> – ativado por cálcio, membro 4 da família.	AAL38546	<b>Citocromo oxidase - subunidade II [Chaitophorus saliniger].</b>
Dino2	QFPPHSPHAPPA	NP_149104	<b>Proteína zinc finger 628</b>	AAA28543.1	<b>Receptor de esteroide</b>
Dino3	HSLKNSMLTVMA	AAK95027	<b>Proteína OR7A5</b> – receptor transmembrânico (família da rodopsina).	EAT39078.1	<b>Proteína vacuolar</b>
Dino4	FPPSQRTAFNDL	AAH43353	<b>Fator de splicing</b> – rico em arginina/serina	NP_524599.1	<b>Receptor de serotonina - receptor 7 CG12073-PA [Drosophila melanogaster]</b>
Dino5	TYHYPIWSKPNT	ABH09189	<b>Receptor de estrogênio beta isoforma 4</b>	AAQ96728.1	<b>Neurotransmissor GABA 1B [Apis mellifera]</b>
Dino6	HTLRVDNLHRPL	AAI04899	<b>Proteína ativadora de Rho GTPase - Rho/Rac/similar a Cdc42.</b>	EAT48228.1	<b>Caderina [Aedes aegypti]</b>
Dino7	AVPRLLTAMSSP	NP_149104	<b>Proteína zinc finger 628</b>	EAT42639.1	<b>Proteína ativadora de synaptic ras gtpase - syngap [Aedes aegypti]</b>

Dino8	YSLRADSRWMPS	NP_000706	<b>Componente 4 do sistema complemento – proteína ligante alpha</b> - região extracelular; processo de ativação do complemento, via clássica; resposta inata do sistema imune.	EAT45826.1	<b>Receptor 7 de glutamato (ampa) [Aedes aegypti]</b>
Dino10	QPHKVFFPNLPR	XP_001129005	<b>Similar a miosina VIIb</b> - estão relacionadas com funções do sistema sensorial como a visão e audição.	AAN34672	<b>Xantine desidrogenase [Drosophila mulleri]</b> - cataliza a reação de oxidação de hipoxantine e xantine para ácido úrico.
Dino11	HSVKRDIVYTAS	AAH65258	<b>RNA helicase superfamília II</b> - replicação, recombinação e reparo do DNA.	AAA85449	<b>Receptor muscarínico de acetilcolina</b> - receptor transembrânico.
Dino13	KAADTMKAYYHT	NP_005168	<b>ATPase envolvida no transporte de H<sup>+</sup>, subunidade a, isoforma 1, lisossomal V0</b> - são bombas de prótons que acidificam os compartimentos intracelulares em células de eucariotos, como exemplo as vesículas sinápticas.	AAR17699	<b>Neuropeptídeo de ativação da biossíntese de hormônio-feromônio diapause</b> - neuropeptídeo com atividade hormonal, neuropeptídeo de sinalização e biossíntese de feromônio.
Dino14	KVWALPDQTPRP	NP_001398	<b>Caderinas</b> – são glicoproteínas envolvidas na sinalização de adesão celular, mediado por Ca <sup>2+</sup> , proliferação, diferenciação e migração.	A56081	<b>Receptor de insulina (Drosophila melanogaster).</b>

Dino15	GNWWDLLWEVDL	AAI03955	<b>Fator de transcrição Sp6</b>	AAM13691	<b>Amino peptidase N [Manduca sexta]</b> - envolvida no transporte de aminoácidos e metabolismo.
Dino16	KVWTLDSSKPPS	NP_004757	<b>Poteína do complexo de revestimento</b> - estão envolvidas no revestimento de vesículas e são essenciais para o tráfico entre o retículo endoplasmático e o Complexo de Golgi.	CAC94468	<b>Fator de transcrição [Tribolium castaneum].</b>
Dino17	SFNANTVYVNYL	AAA60104	<b>Piruvato kinase (PK)</b> – enzima alostérica que regula a glicólise.	EAT42518	<b>Receptor beta adrenérgico [Aedes aegypti]</b> - receptor transmembrânico.
Dino18	HHPTPYMSLSE	NP_005248	<b>Protína 6 ligante a GATA</b> - zinc finger, ligação específica a seqüência promotora do DNA [AT]GATA[AG].	AAX78396	<b>Variante DMIH-A1B2C2 do canal de íon (hiperpolarização/ativação) [Drosophila melanogaster]</b> - transporte de íons.
Dino22	NFLTQNFAPNHN	NP_849144	<b>Membro 10 da superfamília de imunoglobulina</b> – membros são componentes das moléculas de adesão das células neurais (N-CAM L1), Fasciclina II.	EAT41982	<b>Fator de transcrição GATA (GATAb) [Aedes aegypti]</b> - zinc finger, ligação específica a seqüência promotora do DNA [AT]GATA[AG].
Dino25	ANWNYKFSFGAV	AAA82670	<b>T-cell receptor alpha</b> – membros da subfamília IGv são componentes de imunoglobulinas e receptors de células-T.	AAD40864	<b>Citocromo c oxidase subunidade I [Rhygoplitis terminalis].</b>

Dino34	KLWTIPM	BAD96383	<b>Oligodendrócito - mielina, glicoproteína variante</b>	EAT46224	<b>Transporte de aminoácido catiônico [Aedes aegypti].</b>
Dino36	KLRTIPM	AAR32392	<b>Região variável da cadeia pesada da Immunoglobulina –</b> membros da subfamília IGc são componentes de imunoglobulinas, receptors de células-T, glicoproteínas da superfície de células CD1, glicoproteínas secretoras A/C e complexo de Histocompatibilidade (MHC) classe I/II.	EAT41579	<b>Receptor de peptídeo atrial natriurético [Aedes aegypti]</b>
Dino40	KAWIIPA	NP_066003	<b>Receptor potencial de canal de cátions -</b> subfamília M, membro 3 isoforma a; proteína transportadora de íon. Esta família contém canais de sódio, potássio e cálcio.	AAV51845	<b>Citocromo oxidase subunidade II [Leptothorax acervorum]</b>

---

**Tabela 6:** Análise de Bioinformática dos motivos encontrados pelo programa MOTIF2 contra proteínas de Humanos e Insetos. Em colorido os motivos.

Peptídeos	Motivos	Acesso	Alvos Potenciais em Humanos	Acesso	Alvos Potenciais em Insetos
<b>KVWNLLPPPIVR</b> <b>KVWALPDQTPRP</b> <b>KVWTLDSSKPPS</b>	KVWXL	EAW69576	<b>Receptor de glutamato, ionotrópico, N-methyl-D-aspartato 3B</b> - canal de íon. Esta família inclui as quatro regiões transmembrânicas dos receptores ionotrópicos de glutamato e dos receptores de NMDA.	EAT48752	<b>Canal de potássio voltagem dependente [Aedes aegypti]</b> - proteína transportadora de íons.
		EAX10422	<b>Receptor 2 de prokineticina, receptor transmembrânico</b> - as prokineticinas são proteínas secretadas que podem promover o angiogênese e induzir a contração gastrointestinal. É uma proteína integral de membrana e um receptor acoplado a proteína G.	ABG34550	<b>Citocromo P450 CYP4D36 [Musca domestica]</b> - envolvido no metabolismo secundário, biossíntese, transporte e catabolismo.
<b>KVWNLLPPPIVR</b> <b>GNWVDLLWEVDL</b>	WXLL	EAX09935	<b>Zinc finger protein 294, isoform CRA_a</b> - fator de transcrição.	ABG38133	<b>Citocromo b [Axarus sp. 'varvestris']</b> - é a subunidade bc1 do citocromo, enzima da respiração mitocondrial.
		EAX10531	<b>Atractina, isoforma CRA_b</b> - é uma proteína secretada envolvida com as células imunes e aglomera-se durante as respostas inflamatórias.	ABK97410	<b>Vacuolar ATP sintase subunidade B [Bombyx mori]</b> - esta ATPase está envolvida com a hidrólise de ATP, para a formação do gradiente de H <sup>+</sup> .
<b>KLWTIPM</b> <b>KLRTIPM</b>	KLXTIPM	EAW60349	<b>Canal de cálcio voltagem-dependente, alpha 1, subunidade, isoforma CRA_e</b> - controla a entrada rápida de Ca <sup>2+</sup> e está envolvido na sinalização elétrica e celular.	EAT49004	<b>Phd finger - fator de transcrição [Aedes aegypti].</b>
		AAO85093	<b>Receptor de proteína G (GPR112)</b> – está envolvido com mecanismos de sinais de tradução.	AAV91010	<b>Proteinase 12 da hemolinfa [Manduca sexta].</b>

Os alinhamentos das seqüências peptídicas com o banco de dados dos *GeneBank* pelo BLAST não encontraram homologias perfeitas. Vários autores relatam a falta de homologia perfeita dos peptídeos selecionados com as proteínas anotadas (Santamaria et al. 2001; Hu et al. 2006; DU et al. 2006; Freschi 2006; Vieira 2006). Isso pode ser explicado pelo fato da seleção dos fagos ser direcionada para aminoácidos que não dificultem a infectividade do fago durante a replicação, o que diminui o número de partículas virais durante as ampliações, havendo substituição desses aminoácidos por outros com as características físico-químicas semelhantes. Dybwad et al. (2003) mesmo não encontrando homologia perfeita, sugerem possíveis proteínas alvo apresentadas nos alinhamentos com similaridade significativa aos seus peptídeos.

Neste estudo alvos potenciais são apresentados a partir de similaridades significativas entre os peptídeos e seqüências protéicas de *Homo sapiens* anotadas no *GeneBank*. Foram identificadas similaridades entre proteínas do sistema imune, sistema complemento (Dino8), regiões variáveis de imunoglobulinas (Dino22 e Dino36) que podem estar relacionadas com a resposta imune ao veneno, ativadores de GTPase (Dino6), receptores celulares (Dino5, Dino25 e Dino40), proteínas relacionadas à regulação gênica e transcrição (Dino2, Dino7 e Dino15) e proteínas relacionadas com filamento de miosina (Dino10) entre outras.

Analisando similaridade entre os peptídeos e as seqüências protéicas de insetos foram encontradas similaridades com citocromo oxidase (Dino1, Dino25 e Dino40), receptores celulares (Dino2, Dino4, Dino8, Dino11, Dino14, Dino17 e Dino36), fatores de transcrição (Dino16 e Dino22), neurotransmissor GABA (Dino5), canal de íon (Dino18), entre outros.

As análises de similaridade dos motivos selecionados pelo MOTIF2 pelo BLAST encontraram como prováveis alvos em humanos: receptores celulares (KVWxL), fator de transcrição e proteínas relacionadas a processos inflamatórios (WxLL), canal de cálcio e receptor de proteína G (KLxTIPM). Já em insetos, a análise apontou como possíveis alvos canal de potássio e citocromo P450 (KVWxL), citocromo b e ATPase (WxLL), fator de transcrição e proteinase (KLxTIPM).

As seqüências protéicas dos peptídeos selecionados foram alinhadas entre si pelo programa CLUSTAL W (v. 1.83) conforme mostra Figura 4. Foram observados poucos motivos significantes entre os peptídeos (KVWxL, KxxxIP, FPP, HSxK, LRxDxxxxP). O motivo KVWxL também foi obtido pelo programa MOTIF2 e analisado pelo BLAST, sendo os dados já mostrados na Tabela 6. Dos peptídeos Dino10 ao Dino5 não houve formação de motivos relevantes pelo programa.

Dino14	KVWALPDQTPRP	12
Dino1	KVWNLPPPIVR	12
Dino16	KVWTLDSSKPPS	12
Dino34	KLWTIPM	7
Dino36	KLRTIPM	7
Dino40	KAWIIPA	7
Dino2	QFPPHSPHAPPA-	12
Dino4	-FPPSQRTAFNDL	12
Dino3	HSLKNSMLTVMA	12
Dino11	HSVSRDIVYTAS	12
Dino6	HTLRVDNLHRPL	12
Dino8	YSLRADSRWMP	12
Dino10	QPHKVFFPNLPR	12
Dino15	GNWDDLWEVDL	12
Dino7	AVPRLLTAMSSP	12
Dino22	NFLTQNFAPNHN	12
Dino17	SFNANTVYVNYL	12
Dino13	KAADTMKAYYHT	12
Dino25	ANWNYKFSFGAV	12
Dino18	HHPTPYMSLSE	12
Dino5	TYHYPIWSKPNT	12

**Figura 4:** Alinhamento dos 21 peptídeos selecionados pelo programa CLUSTAL W (v. 1.83). Os motivos alinhados estão marcados em colorido. Os peptídeos sem marcas coloridas não apresentaram alinhamentos satisfatórios.

Barbosa (2005) observou que o veneno de *D. australis* age na redução do crescimento das bactérias *Escherichia coli*. Orivel et al. (2001), estudando as propriedades do veneno de *Pachycondyla goeldii* (Hymenoptera, Ponerinae) sugeriram que esta formiga utiliza seu veneno na captura de presas e como proteção contra microorganismos no ninho. Os resultados obtidos por Barbosa (2005) apresentam dados semelhantes e sugerem que *D. australis* utiliza seu veneno para os mesmos fins, tendo em vista que é também uma espécie predadora.

As drogas antimicrobianas podem agir na inibição da síntese da parede celular e de proteínas, bem como na síntese dos ácidos nucleicos e dos metabólitos essenciais. Podem ainda causar danos à membrana plasmática atingindo-a especificamente ou indiretamente, pela lesão da parede celular e sua conseqüente exposição. Antibióticos polipeptídicos que agem na membrana plasmática promovem mudanças na permeabilidade da mesma que resultam na perda de metabólitos importantes da célula do microorganismo (Tortora et al. 2002). Em estudo realizado com fragmentos sintéticos de melitina, observou-se que este peptídeo antimicrobiano exerceu esta atividade permeabilizando a membrana plasmática de bactérias *E. coli* (Subbalakshmi et al. 1999).

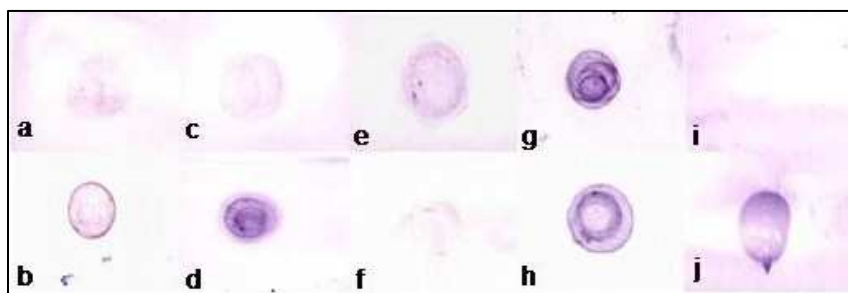
Sabendo que o veneno de *D. australis* tem ação antimicrobiana, realizou-se análise de similaridade pelo programa BLAST com proteínas de *Escherichia coli*. Os resultados obtidos mostraram similaridade com ligantes a penicilina, proteínas de transporte, reguladores de transcrição, proteínas ABC, entre outras.

A família das proteínas ABC (*ATP-Binding Cassete*) compreende uma classe diversa de proteínas de membrana relacionadas com o transporte, que hidrolisam o ATP para translocar soluto entre as membranas biológicas. Os membros dessa família não estão envolvidos somente na endocitose de nutrientes, mas fazem parte de uma variedade de processos biológicos como: transdução de sinal, secreção de proteínas, resistência a drogas, apresentação de antígeno, patogênese e esporulação em bactérias (para revisão veja Schneider e Hunke 1998). As proteínas ABC Transporte são compostas por duas partes: dois domínios integrais de membrana que cruzam seis vezes a membrana e dois domínios de hidrólise do ATP (Higgins 1992).



## **Dot-blotting**

A análise por ensaios de *Dot-blotting* permitiu uma abordagem rápida da eficiência de seleção e especificidade dos clones ao veneno de *D. australis*. Após o isolamento e amplificação dos clones de fagos, estes foram incubados com veneno bruto de *D. australis* aplicados em membranas individuais (Figura 5). Neste teste, todos os clones mostraram reatividade e não apresentaram reatividade frente ao fago selvagem (Helper), o qual não apresenta inserto, utilizado como controle negativo da reação.



**Figura 5:** Análise por *dot-blotting* da expressão do ligante ao veneno de *D. australis*. **a:** Dino1; **b:** Dino2; **c:** Dino3; **d:** Dino4; **e:** Dino5; **f:** Dino6; **g:** Dino7; **h:** Dino8; **i:** Controle negativo; **j:** Controle positivo da reação (fago helper impresso na membrana e incubado com um dos clones).

## **Atividade Hemolítica**

O veneno de *D. australis* apresentou atividade hemolítica (Tabela 7). Esses dados estão de acordo com trabalhos realizados com venenos de formigas e de outros himenópteros. Cologna (2005) testou diferentes concentrações de veneno de *D. australis* e verificou que a concentração de 30 µg (a mesma utilizada neste estudo) foi a que demonstrou melhores resultados. Essa autora reforçou a idéia da presença da enzima fosfolipase no veneno de

*D. australis* sugerindo ainda a presença de componentes semelhantes a melitina.

Orivel et al. (2001) testaram a atividade hemolítica de 10 peptídeos do veneno total de *Pachycondyla goeldii*, uma formiga predadora da subfamília Ponerinae, contra eritrócitos de ovelha e cavalo. Foram identificados peptídeos denominados ponerinas, os quais possuem seqüência similar à melitina, um peptídeo de ação hemolítica presente principalmente em veneno de abelhas. Os resultados mostraram que o veneno total desta formiga tem atividade hemolítica para ambos os eritrócitos. Também testando o potencial hemolítico, Inagaki et al. (2004), verificaram lise de eritrócitos humanos quando submetidos ao veneno de *Myrmecia pilosula*.

Uma das principais enzimas presentes em veneno da maioria de himenópteros é a fosfolipase A<sub>2</sub> que pode ser responsável por muitas reações farmacológicas indiretas (Schmidt 1982). Vários estudos demonstraram a ação sinérgica da fosfolipase A<sub>2</sub> com a melitina nos processos de lise de eritrócitos de mamíferos sendo que esta agiria facilitando a exposição dos fosfolipídios de membrana ao sítio catalítico da fosfolipase A<sub>2</sub> (Watala e Kowalczyk 1990).

Os resultados do teste de inibição da atividade hemolítica dos fagos selecionados conjugados com veneno de *D. australis* (Tabela 7) demonstraram que todas as amostras de fago conjugado com veneno apresentaram halos hemolíticos, indicando a presença de atividade hemolítica no veneno.

Nota-se que não houve diferença entre as amostras que continham fago conjugado com veneno e as amostras que continham apenas fago. Também não houve diferença no diâmetro dos halos entres os fagos utilizados no teste.

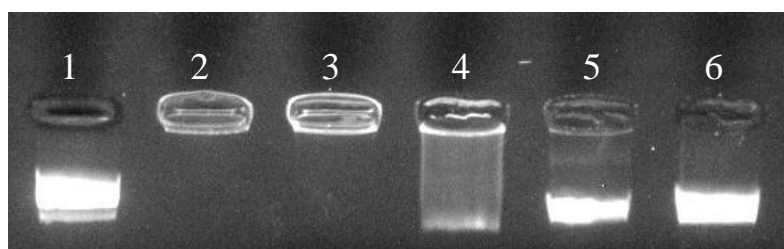
Os fagos estão mimetizando os prováveis ligantes naturais ao veneno. Os resultados sugerem que nenhum desses peptídeos estaria influenciando na ação desse veneno nas condições nas quais o teste foi realizado.

**Tabela 7:** Resultados obtidos no teste de inibição da atividade hemolítica dos fagos conjugados com veneno de *D. australis*. **C:** Controle (Tampão PBS sem veneno); **V<sub>1</sub>:** veneno bruto; **F:** Fago; **Dino1 – Dino8:** clones incubados com veneno).

Amostras		Quantidade		Halo hemolítico	Diâmetro do halo (mm)
<b>C</b>	Controle	13µL	-----	Não	-----
<b>F</b>	Fago	10µL	10 <sup>11</sup>	Não	-----
<b>V<sub>1</sub></b>	Veneno	3µL	3µg	Sim	12,71
<b>Dino1</b>	peptídeo 2A + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	12,55
<b>Dino2</b>	peptídeo 5A + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	13,53
<b>Dino3</b>	peptídeo 3C + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	12,69
<b>Dino4</b>	peptídeo 6C + veneno	10 µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	13,75
<b>Dino5</b>	peptídeo 3D + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	13,67
<b>Dino6</b>	peptídeo 6F + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	13,13
<b>Dino7</b>	peptídeo 1G + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	13,53
<b>Dino8</b>	peptídeo 3G + veneno	10µL + 3µL	10 <sup>11</sup> + 3µg	Sim	13,75

## Atividade Nucleásica

O teste de atividade nucleásica (Figura 6), que utilizou DNA extraído de fago M13 como Controle, mostrou que nas concentrações de 10  $\mu\text{g}$  e 5  $\mu\text{g}$  de veneno, a banda de DNA desapareceu, porém, não se detecta rastro que indique degradação da molécula. Sugere-se que exista um excesso de proteína que conjugada ao DNA impede que este penetre na malha do gel. Na concentração de 2,5 $\mu\text{g}$  de veneno nota-se um rastro que pode estar relacionado à degradação de DNA e nas concentrações de 1,25 $\mu\text{g}$  e 0,75 $\mu\text{g}$ , o veneno não exerceu atividade sobre o DNA, que se manteve inalterado, semelhante ao Controle.



**Figura 6:** Atividade nucleásica do veneno de *D. australis*. **1:** 200 ng de DNA de fago M13, Controle. **2:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 10 $\mu\text{g}$  veneno de *D. australis*. **3:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 5 $\mu\text{g}$  veneno de *D. australis*. **4:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 2,5 $\mu\text{g}$  veneno de *D. australis*. **5:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 1,25 $\mu\text{g}$  veneno de *D. australis*. **6:** 200ng DNA de fago M13 incubado com 0,75 $\mu\text{g}$  veneno de *D. australis*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Izidoro et al. (2006) que testando a atividade nucleásica de L-amino acid oxidase (LAAO) isolada do veneno de *Bothrops pirajai* em DNA de fago M13, mostraram que em concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g}$  ocorre a degradação do DNA.

## **Inativação de partículas de fago pelo veneno de *D. australis***

Neste teste, a titulação foi realizada para testar a capacidade de inativação das partículas de fago pelo veneno de *D. australis*. Os resultados indicam que na concentração de 10 µg de veneno bruto (mesma concentração utilizada no *biopanning*), o mesmo não foi capaz de inativar as partículas de fago, já que se encontram colônias azuis em quantidades semelhantes tanto no experimento Controle, que titulou apenas fago, como no experimento Teste que titulou fago conjugado com veneno. Estes resultados confirmam a eficiência do *biopanning*, já que demonstram que o veneno não teve atividade de inativação sobre os fagos.

A presente investigação teve sucesso na identificação de peptídeos de interesse, ligantes específicos ao veneno de *D. australis* por *Phage Display*, os quais podem ser moléculas-alvo importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Este trabalho contribuiu com informações sobre a formiga *D. australis*, fornecendo informações sobre seu veneno. Contribuiu, ainda, com subsídios para que outros trabalhos complementares sejam realizados com o intuito de aprofundar os dados aqui obtidos.

---

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

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

Barbas, CF., Burton, DR., Scott, JK., Silverman, GJ., 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York. pp.8.4 – 8.7.

Barbosa, DB., 2005. Atividade antimicrobiana da peçonha de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). Monografia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

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

Brígido, MM., Maranhão, AQ., 2002. Phage Display Libraries. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 26, 46-51.

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

Cologna, CT., 2005. Estudos Bioquímicos e Biológicos da peçonha de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). Monografia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Du, B., Qian, M., Zhou, Z., Wang, P., Wang, L., Zhang, X., Wu, M., Zhang, P., Mei, B., 2006. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. Biochem Biophys Res Commun: 342, n. 3, 956-962.

Dybwad, A., Lambin, P., Sioud, M., Zouali, M., 2003. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. *Scand J Immunol*, v. 57, n. 6, p. 583-590.

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

Freitas, JS., Molina, FB., 2000. Preliminary observations on prey consumption and feeding behavior of *Dinoponera australis* and *D. gigantea* at São Paulo Zoo (Hymenoptera, Formicidae). *Arq.Inst.Biol.* 67, 1-145.

Freschi, APP., 2006. *Desenvolvimento de Aplicações Tecnológicas da Metodologia de phage display no Diagnóstico do Câncer de Próstata*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Gutiérrez, JM., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 23, 411-413.

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.

Higgins, CF., 1992. ABC transporter: from microorganism to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.

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



Hu, S., Guo, X., Xie, H., Du, Y., Pan, Y., Shi, Y., Wang, J., Hong, L., Han, S., Zhang, D., Huang, D., Zhang, K., Bai, F., Jiang, H., Zhai, H., Nie, Y., Wu, K., Fan, D., 2006. Phage display selection of peptides that inhibit metastasis ability of gastric cancer cells with high liver-metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun*: 341, n. 4, 964-972.

Inagaki, H., Akagi, M., Imai, HT., Taylor, RW., Kubo, T., 2004. Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 428, 170 - 178.

Izidoro, LFM., Ribeiro, MC., Souza, GRL., Sant'Ana, CD., Hamaguchi, A., Honsi-Brandeburgo, MI., Goulart, LR., Beleboni, RO., Nomizo, A., Sampaio, SV., Soares, AM., Rodrigues, VM., 2006. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pirajai snake venom *Bioorganic & Medicinal Chemistry* . 14(20),7034-7043.

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

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

New England Biolabs, 2007. FAQs For Phage Display Peptide Libraries. Disponível em: [http://www.neb.com/nebecomm/tech\\_reference/drug\\_discovery/phdFaq.asp](http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/drug_discovery/phdFaq.asp) Acessado em 04 jan. 2007.

Noren, KA., Noren, CJ., 2001. Construction of high-complexity combinatorial Phage Display peptide libraries. *Methods*: 23, 169-178.

Orivel, J., Redeker, V., Caer, JP., 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.

Phizicky, EM., Fields, S., 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. Microbiol. 59, 94-123.

Rodi, JD., Soares, AS., Makowski, L., 2002. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide Phage Display libraries. Journal of Molecular Biology..322, 1039–1052.

Santamaría, H., Manoutcharian, K., Rocha, I., Gonzalez, E., Acero, G., Govezensky, T., Uribe, I., Olguin, A., Paniagua, J., Gevorkian, G., 2001. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from papillomavirus-infected patients using phage display libraries. Clinical immunology: 101, n.3, 296-302.

Santos, PS., 2006. Seleção e caracterização de peptídeos recombinants miméticos de antígenos do vírus da dengue por Phage Display. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Schmidt, JO., 1982. Biochemistry of insects venom. Ann. Rev. Entomol. 27, 339-368.

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

Schneider, E., Hunke, S., 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects o the ATP-hydrolyzing subunits/domains. FEMS Microbiology Reviews 22, 1-20.

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

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

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.

Tortora, GJ., Funke, BR., Case, CL., 2002. *Microbiologia*. Artmed Editora S. A., Porto Alegre, 830p.

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.

Watala, C., Kowalczyk, JK., 1990. Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 97(C), 187-194.

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

---

---

## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

---

A seleção e identificação de peptídeos ligantes ao veneno de *D. australis* por meio de *Phage Display* revelaram que:

- A técnica de *Phage Display* foi eficiente para a caracterização de peptídeos ligante ao veneno de *D. australis*, identificando três motivos protéicos freqüentes: KVVxL, WxLL e KLxTIPM.
- O peptídeo KVVNLLPPPIVR foi o mais freqüente e o quinto com maior grau de informação e o peptídeo AVPRLLTAMSSP foi o que apresentou o maior grau de informação, embora todos os clones selecionados tenham apresentado reatividade específica ao veneno.
- Nenhum dos peptídeos selecionados influenciou na atividade hemolítica do veneno.
- O teste de atividade nucleásica mostrou que a concentração de 2,5 µg de veneno pode provocar degradação na molécula de DNA.
- O teste de inativação de partículas de fago pelo veneno de *D. australis* demonstrou que a concentração de 10 µg de veneno bruto, a mesma usada no processo de seleção, não foi capaz de inativar as partículas de fago.