
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**ANÁLISE PEPTIDÔMICA DOS VENENOS DE VESPAS SOCIAIS
NEOTROPICAIS**

NICOLI BARÃO BAPTISTA SAIDEMBERG

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro/SP, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (área de concentração: Biologia Celular e Molecular).

Fevereiro - 2011

NICOLI BARÃO BAPTISTA SAIDEMBERG

**ANÁLISE PEPTIDÔMICA DOS VENENOS DE
VESPAS SOCIAIS NEOTROPICAIS**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO SERGIO PALMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

**RIO CLARO
FEVEREIRO/2011**

595.798 Baptista-Saidemberg, Nicoli Barão
B222a Análise peptidômica dos venenos de vespas sociais
neotropicais / Nicoli Barão Baptista-Saidemberg. - Rio Claro
: [s.n.], 2011
135 f. : il., figs., gráfs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Vespa. 2. Biologia estrutural e funcional. 3. Veneno de
vespas. 4. Peptídeos. 5. Espectrometria de massas. 6.
Atividades biológicas. I. Título.

*“Um velho índio descreveu certa vez:
- Dentro de mim, existem dois cachorros: um deles é cruel e mau, o
outro, muito bom. Os dois estão sempre brigando.
Quando perguntaram qual dos cachorros ganharia a briga, o sábio índio
parou, refletiu e respondeu:
- Aquele que eu alimento.”*

*“Que Deus me conceda falar com inteligência
E um pensar semelhante a este dom,
Pois ele não só mostra o caminho da sabedoria,
Mas também dirige os sábios;
nas suas mãos estamos nós, as nossas palavras,
Toda a inteligência e a perícia do agir.”
(Apelo a inspiração divina - Sabedoria 7:15-21)*

Mandamentos para a toda a vida

- 1. Não faça aos outros o que não quer que façam com você*
- 2. Em todas as coisas, faça de tudo para não provocar o mal*
- 3. Trate os outros seres humanos, as outras criaturas e o mundo em geral com amor, honestidade, fidelidade e respeito*
- 4. Não ignore o mal nem evite administrar a justiça, mas sempre esteja disposto a perdoar erros que tenham sido reconhecidos por livre e espontânea vontade e lamentados com honestidade*
- 5. Viva a vida com um sentimento de alegria e deslumbramento*
- 6. Sempre tente aprender algo de novo*
- 7. Ponha todas as coisas à prova; sempre compare suas idéias com os fatos, e esteja disposto a descartar mesmo a crença mais cara se ela não se adequar a eles*
- 8. Jamais se autocensure ou fuja da dissidência; sempre respeite o direito dos outros discordar de você*
- 9. Crie opiniões independentes com base em seu próprio raciocínio e em sua experiência; não se permita ser dirigido pelos outros*
- 10. Questione tudo*

Richard Dawkins

11. Enfim, Seja Feliz!!

LIÇÕES PARA A VIDA... AGRADECIMENTOS

Sempre gostei de ler, mas sem dúvidas foram nesses últimos quatro anos que mais me aprofundei no mundo literário, motivada por uma profunda sede de entender o mundo a minha volta, entender a natureza do SER humano...

O que é o sucesso verdadeiro e como faço para alcançá-lo?

Nesse período aprendi não só o que este projeto apresentará a quem se dispor a lê-lo como também aspectos importantes que levarei para toda minha vida:

Percebi que, a não ser que façamos algo diferente, não importa quão formidável sejam nossos talentos, nossos comportamentos restringirão nosso desempenho. Sendo assim, quanto menos resistentes as mudanças, maior será nosso crescimento pessoal.

Aprendi que devemos nos manter atentos às direções em que nos movemos, pois sempre nos será revelado o tamanho de nossa força e onde ela deve ser empregada. A partir daí, busquei conhecer meus pontos fortes, aumentando minha auto-estima e autoconfiança. Assumi também meus pontos fracos, e dia-a-dia, procuro minimizar suas conseqüências.

A partir desse momento decidi ser melhor que ontem, ser reconhecida unicamente por mim mesma e definir minhas metas em curto, médio e longo prazo. Não me importa quantas vidas terei o prazer de viver, importa fazer diferença nessa vida. Tudo é belo demais para deixar de ser feliz! Trabalho com o que amo e o faço com paixão e determinação!

Portanto, uma vez que todos nós influenciamos e exercemos efeitos sobre os outros, devemos nos esforçar para agir de forma positiva a fim de melhorar a nós mesmos e todos a nossa volta.

A autoconfiança é importante, mas em excesso ela pode ser perigosa, impedindo nosso crescimento pessoal e dos que estão a nossa volta. Uma vez que o saber é ilimitado, a autoconfiança deve ser equilibrada com humildade. Por isso, nada de ser como Napoleão na campanha da Rússia!

Em nossa caminhada muitas vezes desagradamos pessoas e nos frustramos por isso, principalmente quando valorizamos o que elas pensam a nosso respeito. Compreendi o quão difícil deve ser administrar situações de conflito em que pessoas causadoras de atrito acabem sendo mantidas em uma equipe, por se acreditar que delas seja possível tirar algo positivo. Podemos nunca entender os reais motivos para tais decisões, e uma vez que não podemos mudar o mundo, pelo menos devemos fazer nossa parte.

Talvez a lição mais importante que aprendi é que devemos procurar focar os pontos positivos que cada um tem, investindo nesses aspectos... Isso vale pra mim mesma ao me olhar no espelho e, nesse momento, me sinto como Michelangelo quando esse disse: 'Eu vi um anjo em um bloco de mármore e o esculpi para libertá-lo!'

Por tudo isso, meus agradecimentos...

*Sempre, e em primeiro lugar, ao Deus do meu coração e da minha compreensão.
"A fé é como o amor: não há nada que a force" (Arthur Schopenhauer)*

Novamente pela orientação do prof. Dr. Mario Sergio Palma, e pela liberdade que me foi dada para exercer minha criatividade em relação ao desenrolar deste trabalho.

"Grandes líderes mudam de estilo para levantar a auto-estima de suas equipes. Se as pessoas acreditam nelas mesmas, é impressionante o que elas conseguem realizar" (Sam Walton)

*As vespas sociais Agelaia pallipes pallipes e Agelaia vicina, aos ratos Wistar e camundongos Swiss, utilizados neste trabalho: sem elas, este estudo não seria possível.
"A natureza é grande nas coisas grandes e grandíssima nas pequeninas" (Saint-Pierre)*

Aos colaboradores deste trabalho:

Dr. Daniel M. Saidemberg, pelo treinamento nas análises de ESI-MS e de ESI-MS/MS;

Dra. Patrícia Brigatte, pelo treinamento nos ensaios farmacológicos;

Dra. Rosane Aparecida Ribeiro, pelo treinamento nos ensaios fisiológicos;

Dra. Helen A. Arcuri, pelo treinamento em análises de Modelagem e Dinâmica Molecular;

CAPES, pelo fomento.

"Com talento ganhamos partidas; com trabalho em equipe e inteligência ganhamos campeonatos" (Michael Jordan)

Ao meu esposo Dr. Daniel M. Saidemberg além de companheiro de laboratório, meu melhor amigo e cúmplice, que soube me apoiar e me criticar nas horas certas, sempre ao meu lado me lembrando que o mais importante é ser uma pessoa melhor a cada dia!

Ao meu filhote Iofi, meu cãozinho, também parte integral de nossa família; com suas estripulias faz com que as energias se renovem ao nosso redor!

"A realização não vem com a conquista dos objetivos traçados, mas sim no caminho percorrido até alcançá-lo" - "Tomando a decisão e realmente querendo, os próprios pés o conduzem para a realização"(Prof. Alan Henrique/Textos Judaicos)

A Dra. Patrícia Brigatte, Edson da Silva e Danilo Mourelle, amigos do coração, que me ensinaram a cuidar melhor do biotério.

A Dra. Lucilene D. dos Santos, BSc. José Roberto A. S. Pinto, BSc. Anally R. Menegasso, Marília Pieroni, Franciele Grego Esteves, Marília Pieroni e Ana Maria Caviquioli, Vanessa A. Alves e Sebastião G. Filho, agradeço pelas conversas, conselhos e momentos de descontração.

Dra. Rosane A. Ribeiro, MSc. Priscila Muniz Ribeiro da Silva, MSc. Júnia Carolina Rebelo dos Santos Silva e MSc. Thiago Martins Batista, meus novos companheiros de laboratório, 'workaholics' como eu, mas que também sabem se divertir e fazer dos momentos mais 'apertados', momentos de muita alegria. Obrigada pela recepção!

"O que une uma equipe é quando um cobre as fraquezas do outro" (Phil Jackson)

*A Dra. Bibiana M. de Souza, ao Dr. Paulo Cesar Gomes e BSc. Nathalia B. Dias, que me ensinaram como ser mais forte e enfrentar as adversidades naturais do ser humano.
"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina" (Cora Coralina)*

*Enfim, aos meus pais, Luis e Maria, meus irmãos, Fellipe e Bruno: você's foram a base do que sou agora: obrigada!
"O verdadeiro amor nunca se desgasta. Quanto mais se dá mais se tem" (Antoine de Saint-Exupéry)*

LISTA DAS ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Soro Albumina Bovina
Ca⁺²	Cálcio
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CCP4	<i>Collaborative Computacional Project no 4</i>
cmM	Carbamidometilação
C-18	Octadecil
CP	Peptídeo Quimioctático
DTT	Ditiotreitol
EMP-AF	Eumenine Mastoparano AF
ESI	Ionização por spray de elétrons
Fmoc	Fluorenyl-methoxy-carbonyl
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IAA	Iodoacetamida
K⁺	Potássio
LC-IT-TOF-MS	Sistema hifenado de cromatografia líquida com espectrómetro de massas do tipo Ion trap TOF (Tempo de Vôo)
LDH	Enzima lactato desidrogenase
MCD	Mast Cell degranulation
MCM	Mast Cell medium
MeCN ou ACN	Acetonitrila
Mg⁺	Magnésio
MP	Mastoparano
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas seqüenciais (<i>tandem</i>)
NNM	N-metilmorfolina
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PTH-Aminoácido	Feniltiohidantoína - aminoácido
PyBOP	Benzotriazole-l-yl-oxy-trispyrrolidino-phosphoniumhexafluorofosfato
SH	Solução de p-nitrofenil-N-acetil-b-glucosaminidina em citrato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	Áido tetrafluoroetileno
Tris	Hidroximetilaminometano
Triton X-100	t-octilfenoxipolietanol
Ves-CP	Peptídeos quimiotáticos de vespas

LISTA DE TABELAS

		pgs
TABELA 1	Sequência primária de cininas isoladas dos venenos de vespas	22
TABELA 2	Sequência primária dos peptídeos mastoparanos isolados dos venenos de vespas	24
TABELA 3	Peptídeos quimiotáticos isolado do veneno de vespas	31
TABELA 4	Peptídeos antibióticos isolados dos venenos de vespas	36
TABELA 5	Peptídeos com pontes dissulfetos isolados do veneno de vespas	38
TABELA 6	Sequências dos peptídeos isolados e identificados para a síntese	42
TABELA 7	Etapas de cada ciclo da síntese de peptídeos	43
TABELA 8	Alinhamento entre os peptídeos Protonectina, Protonectina (1-6)-OH e Protonectina (7-12), todos isolados dos venenos de vespas do gênero <i>Agelaia</i>	72
TABELA 9	Alinhamento dos peptídeos com resíduos de cisteína isolados das vespas sociais <i>Protonectaria silveirae</i> , <i>Protopolybia sedula</i> , <i>Synoeca cyanea</i> , <i>Polybia paulista</i> , <i>Protopolybia exígua</i> e <i>Agelaia pallipes pallipes</i> , utilizando-se o programa MULTIALIGN (http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl)	75
TABELA 10	Sequências de aminoácidos de cada peptídeo purificado do veneno da vespa social <i>A. p. Pallipes</i>	79
TABELA 11	Códigos de acesso ao PDB dos moldes escolhidos; os valores de identidade e similaridade entre as sequências dos peptídeos do presente estudo e as sequências dos peptídeos utilizados como molde, assim como também o método de resolução de cada molde	82
TABELA 12	Análise da qualidade estereoquímica para os modelos dos peptídeos <i>Agelaia</i> MP-I e <i>Agelaia</i> MP-II	88
TABELA 13	Sequências de aminoácidos de cada peptídeo purificado do veneno da vespa social <i>A. vicina</i>	92
TABELA 14	Comparação entre as dose efeito dos peptídeos testados	100

LISTA DE FIGURAS

		Pgs
FIGURA 1	Esquema mostrando o aumento de massa após cada evento de reação de redução e alquilação de uma molécula peptídica hipotética	45
FIGURA 2	Ilustração e imagem de uma câmara de quimiotaxia	52
FIGURA 3	Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social <i>A. p. pallipes</i> RP-LCMS (SHIMADZU, Kyoto) utilizando-se de uma coluna WATERS Acquity UPLC® BEH130 C-18 (2,1 x 100mm, 3,5 µM), e um fluxo constante de solventes de 0,2 ml/min. A eluição foi realizada inicialmente em condições isocráticas de 0 a 5 minutos com 5% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA), seguida por um gradiente linear de 5 a 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 5,1 a 42,0 min a 28 °C	59
FIGURA 4	A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração App-5. B) Espectro de massas MS ² da fração 5, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos	62
FIGURA 5	A) Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 6; B) Espectro de massas MS ² da fração 6, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos	63
FIGURA 6	A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração 7; B) Espectro de massas MS ² da fração 7, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos	65
FIGURA 7	A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração 8 em sua forma natural; B) espectro ESI-MS da fração 8 após redução e carboximetilação dos resíduos de cisteína; C) espectro MS ³ deconvolvido da fração 8 reduzida e carboxyamidada, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos	67
FIGURA 8	A) Espectro ESI-MS da fração 9a na sua forma natural; B) espectro ESI-MS da fração 9a após redução e carboximetilação das pontes dissulfeto; C) espectro MS ³ deconvolvido da fração 9 a reduzida e carboxyamidada, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação	69
FIGURA 9	A) Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 9b. B) espectro de massas MS ² da fração 9b, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos	71
FIGURA 10	Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração App-10. Espectro ESI-MS/MS da Pallipina-III, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos. Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração App-10a. A) ESI-MS da Pallipina-III natural e B) ESI-MS da Pallipina-III após redução e carboximetilação das pontes dissulfeto, mostrando que a diferença entre a massa do peptídeo natural apresentou um aumento de 116 unidades de massas, indicando a presença de 2 resíduos de cisteína na molécula	74
FIGURA 11	A) Espectro de massas do tipo ESI-MS da fração 11. B) espectro MS ² da fração 11, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em seuência de aminoácidos	76

FIGURA 12	A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração 12; B) espectro MS ² da fração 12, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos	77
FIGURA 13	Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de <i>A. p. pallipes</i> , mostrando as identificações obtidas. Referências: Saidemberg 2009; Saidemberg et al 2010, Baptista-Saidemberg et al 2010	79
FIGURA 14	Esquema mostrando a distribuição anfifílica (helical well) dos peptídeos (A) Agelaia MP-I e (B) Agelaia MP-II. Legenda das cores: Em verde, resíduos hidrofílicos; em vermelho, resíduos positivamente carregados; em azul, resíduos negativamente carregados e em preto, resíduos hidrofóbicos	80
FIGURA 15	Imagens geradas pelo programa MolMol da estrutura secundária (em ribbon) dos peptídeos Agelaia MP-I, representado em duas faces (A); Agelaia MP-II (B) e Pallipina-I (C)	83
FIGURA 16	Imagens geradas pelo programa PyMol da conformação estrutural em ribbon e na forma de densidade superficial de carga, dos peptídeos Agelaia MP-I (A), Agelaia MP-II (B) e Pallipina-I (C). Legenda: em branco, resíduos de carga neutra; em azul resíduos de cargas positivas; em vermelho, resíduos de carga negativa	84
FIGURA 17	Diagrama de Ramachandran gerado pelo Procheck para o modelo para os peptídeos Agelaia MP-I (A), e Agelaia MP-II (B)	86
FIGURA 18	Diagrama de Ramachandran gerado pelo Procheck para o modelo para os peptídeos Pallipina-I	87
FIGURA 19	Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social <i>A. vicina</i> (TIC) RP-LCMS (SHIMADZU, Kyoto) utilizando-se de uma coluna WATERS Acquity UPLC® BEH130 C-18 (2,1 x 100mm, 3,5 μM), e um fluxo constante de solventes de 0,2 ml/min. A eluição foi realizada inicialmente em condições isocráticas de 0 a 5 minutos com 5% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA), seguida por um gradiente linear de 5 a 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 5,1 a 42,0 min a 28 °C	89
FIGURA 20	Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 7. Espectro ESI-MS/MS da fração 7 isolada do veneno bruto da vespa social <i>A. vicina</i> , com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos	90
FIGURA 21	Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 11	91
FIGURA 22	Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 12	92
FIGURA 23	Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de <i>A. vicina</i> , mostrando as identificações obtidas	93
FIGURA 24	Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina incubados à 37° C	95
FIGURA 25	Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II, incubados à 37° C	96
FIGURA 26	Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III, incubados à 37° C	96
FIGURA 27	Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-	97

	OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina	
FIGURA 28	Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II	98
FIGURA 29	Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III	99
FIGURA 30	Ensaio de quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares isolados de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina	99
FIGURA 31	Ensaio de quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares isolados de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II	100
FIGURA 32	Ensaio de quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares isolados de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III	100
FIGURA 33	Efeito do peptídeo Protonectina sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema).	102
FIGURA 33	Efeito do peptídeo Protonectina (1-5) sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema)	103
FIGURA 34	Efeito do peptídeo Protonectina (1-6) sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema).	104
FIGURA 35	Efeito do peptídeo Palipina sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema)	106
FIGURA 36	Efeito do peptídeo Palipina sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema) sobre o efeito algogênico da carragenina.	106
FIGURA 37	Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 10 μ M do peptídeo Agelaia MP-I. Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL	108
FIGURA 38	Secreção estática de insulina frente à glicose 2,8 (G2.8) e 11,1 mM (G11.1) na presença de Agelaia MP-I 8 μ M, ou em sua ausência. Dados representam a média \pm EPM n = 8. *P < 0,05 vs CTL na mesma condição	109
FIGURA 39	Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 1 μ M do peptídeo Pallipina-I (cadeia aberta). Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL	110
FIGURA 40	Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 1 μ M do peptídeo Pallipina-II. Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL	111
FIGURA 41	Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 1 μ M do peptídeo Pallipina-III. Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL	111
FIGURA 42	Esquema ilustrativo propondo possíveis mecanismos de ação dos peptídeos isolados dos venenos das vespas sociais Agelaia pallipes pallipes e Agelaia vicina	113

LISTA DE ESQUEMAS

	pgs
ESQUEMA 1	Esquema exemplificando as reações de acetilação da (A) lisina e (B) posição N-terminal de um aminoácido hipotético 46
ESQUEMA 2	Esquema ilustrativo de como ocorre a quimiotaxia de células em uma câmara de quimiotaxia. Modificado de AKASHI et al 2005 52

**TABELA DE COMPOSIÇÃO, MASSA MOLECULAR E TEMPO DE RETENÇÃO*
DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS**

AMINOÁCIDO	COMPOSIÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO	MASSA MÉDIA	MASSA MONOISOTÓPICA	ÍON IMONIUM
Glicina, Gly, G	C ₂ H ₃ NO	5.26	57,02146	57,02146	30
Alanina, Ala, A	C ₃ H ₅ NO	6.65	71,03711	71,0371	44
Serina, Ser, S	C ₃ H ₅ NO ₂	4.25	87,0782	87,03203	60
Prolina, Pro, P	C ₅ H ₇ NO	12.22	97,1167	97,05276	70
Valina, Val, V	C ₅ H ₉ NO	11.79	99,1326	99,06841	72
Treonina, Thr, T	C ₄ H ₇ NO ₂	4.61	101,1051	101,04768	74
Cisteína, Cis, C	C ₃ H ₅ NOS	---	103,1448	103,00919	76
Isoleucina, Ile, I	C ₆ H ₁₁ NO	17.58	113,1595	113,08406	86 (72)
Leucina, Leu, L	C ₆ H ₁₁ NO	18.99	113,1595	113,08406	86 (72)
Aspargina, Asn, N	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	3.84	114,1039	114,04293	87 (70)
Ácido Aspártico, Asp, D	C ₄ H ₅ NO ₃	2.45	115,0886	115,02694	88
Lisina, Lys, K	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	17.03	128,1742	128,09496	101 (129, 112, 84, 70)
Glutamina, Gln, Q	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	4.06	128,1308	128,05858	101 (129, 84)
Ácido Glutâmico, Glu, E	C ₅ H ₇ NO ₃	3.14	129,1155	129,04259	102
Metionina, Met, M	C ₅ H ₉ NOS	11.44	131,1986	131,04049	104 (61)
Histidina, His, H	C ₆ H ₇ N ₃ O	4.90	137,1412	137,05891	110 (166, 138, 123, 121, 82)
Fenilalanina, Phe, F	C ₉ H ₉ NO	16.49	147,1766	147,06841	120 (91)
Arginina, Arg, R	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	7.66	156,1876	156,10111	129 (112, 100, 87, 73, 70, 59)
Tirosina, Tyr, Y	C ₉ H ₉ NO ₂	14.43	186,2133	186,07931	159
Triptofano, Trp, W	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	7.04	163,1760	163,06333	136

* Obtido para PTH-aminoácidos em seqüenciador automático de fase gasosa PPSQ-21A (SHIMADZU): sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) calibrado com padrões de PTH-aminoácidos (WAKO CHEM), equipado com uma bomba modelo LC-10AS (SHIMADZU) e um detector de luz ultravioleta modelo SPD-10A, acoplados ao próprio seqüenciador. O controle do sistema e aquisição dos dados foi realizado através do software PPSQ-20 Data Processing e CLASS LC-10A.

ÍNDICE

NUM	TÍTULOS	PGS
	RESUMO	14
	ABSTRACT	16
1	INTRODUÇÃO	18
2	OS CONSTITUINTES DOS VENENOS DE HIMENOPTEROS	21
2.1	Compostos Peptídicos	21
2.1.1	As Cininas	22
2.1.2	Os Mastoparanos	23
2.1.3	Os Peptídeos Quimiotáticos	30
2.1.4	Peptídeos Neuroativos	33
2.1.5	Peptídeos Antibióticos	35
2.1.6	Outras Atividades Encontradas	37
3	OBJETIVOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Material biológico	41
4.2	Metodologias	41
4.2.1	Extração e Liofilização do veneno	41
4.2.2	Espectrometria de Massas ESI-MS	41
4.2.3	Síntese Manual de Peptídeos em Fase Sólida	42
4.2.4	Redução e Carbamidometilação dos Resíduos de Cisteína	43
4.2.5	Redução e Carboximetilação dos Resíduos de Cisteína	44
4.2.6	Acetilação dos Resíduos de Lisina	45
4.2.7	Modelagem Molecular por Homologia e Métodos de avaliação dos modelos estruturais	46
4.2.8	Atividades Funcionais	48
4.2.8.1	Atividade Hemolítica	48
4.2.8.2	Animais	49
4.2.8.3	Atividade Degranuladora de Leucócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de Ratos Wistar Machos	50
4.2.8.4	Atividade Quimiotática para Leucócitos Polimorfonucleares (PMNL's)	51
4.2.8.5	Atividades Farmacológicas de Dor e Inflamação	53
4.2.8.5.1	Von Frey Eletrônico	53
4.2.8.5.2	Edema de Pata	54
4.2.8.6	Atividades Fisiológicas de Metabolismo do Pâncreas Endócrino	54
4.2.8.6.1	Isolamento das Ilhotas Pancreáticas	54
4.2.8.6.2	Secreção Estática de Insulina	55
4.2.8.6.3	Dosagem da Secreção de Insulina	55
4.2.9	Análises Estatísticas	56

5	RESULTADOS	
5.1	Resultados e Discussão Obtidos nas Análises do Veneno da Vespa Social	59
	<i>Neotropical Agelaia pallipes pallipes</i>	
5.1.1	Separação dos Componentes Peptídicos	59
5.1.2	Fracionamento e Sequenciamento dos Peptídeos	60
5.1.3	Modelagem Molecular Por Homologia	79
5.2	Resultados e Discussão Obtidos nas Análises do Veneno da Vespa Social	89
	<i>Neotropical Agelaia vicina</i>	
5.2.1	Fracionamento e Sequenciamento das Frações Obtidas	89
5.3	RESULTADOS DE ATIVIDADES FUNCIONAIS	95
5.3.1	Atividade Hemolítica	95
5.3.2	Atividade Desgranuladora de Mastócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de	97
	Ratos Wistar Machos	
5.3.3	Atividade Quimiotáctica para Leucócitos Polimorfonucleares (PMNL's)	98
5.3.4	Resultados dos Ensaios de Dor e Inflamação	101
5.3.5	Ensaios de Secreção de Insulina	106
6	CONCLUSÕES	115
7	REFERÊNCIAS	117

RESUMO

Os peptídeos possuem um papel essencial para as funções fisiológicas de animais, plantas e de alguns microrganismos, e frequentemente apresentam-se como candidatos a novas drogas na sua forma natural, servindo como modelos para o “desenho” de peptídeos modificados, para uma obtenção de perfis farmacológicos melhores. Neste contexto, os venenos das vespas sociais são interessantes sob o ponto de vista da pesquisa, uma vez que são ricos em peptídeos policatiônicos envolvidos com processos inflamatórios (lise de membranas, Desgranulação de mastócitos, quimiotaxia, entre outros processos), além de efeitos antibióticos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma bioprospecção dos diferentes componentes peptídicos presentes nos venenos das vespas sociais *Agelaia pallipes pallipes* e *Agelaia vicina*, através da identificação e da caracterização estrutural e funcional dos componentes peptídicos mais abundantes destes venenos. Para isso, os venenos das vespas supracitadas foram extraídos em acetonitrila, fracionados por cromatografia de fase reversa e analisado por espectrometria de massas (ESI-MS e ESI-MSⁿ). Todos os peptídeos caracterizados foram sintetizados manualmente por estratégia Fmoc, para a realização de ensaios farmacológicos e fisiológicos. Além de abrir novas vertentes de estudos estruturais e funcionais, o presente projeto alcançou os objetivos inicialmente almejados, identificando e caracterizando estruturalmente doze peptídeos presentes nos venenos das duas espécies de vespas. As denominações e atividades biológicas dessas moléculas foram: Protonectina apresentou-se lítico para hemáceas, degranulador de leucócitos, quimiotático, induziu o fenômeno de hiperalgisia e foi edematogênico; o peptídeo Protonectina (1-4)-OH apresentou-se hemolítico para eritrócitos e desgranulador de mastócitos; o peptídeo Protonectina (1-5)-OH apresentou-se como quimiotático para leucócitos e hiperalgésico; o peptídeo Protonectina (1-6)-OH apresentou-se como quimiotático; o peptídeo protonectina (1-6) apresentou-se como quimiotático e hiperalgésico; o peptídeo protonectina (7-12) apresentou-se como quimiotático; o peptídeo Agelaia MP-I apresentou-se lítico para hemáceas, desgranulador de leucócitos e estimulador da secreção de insulina (a via de ação ainda não foi determinada); o peptídeo Agelaia MP-II apresentou efeitos líticos e desgranulador de mastócitos de ratos menos potente que o agelaia MP-I. O peptídeo Pallipina-II não apresentou nenhuma atividade detectável até o momento, enquanto que o peptídeo Pallipina-III apresentou-se como inibidor da secreção de insulina (por mecanismo ainda não determinado). Dessa forma,

esses resultados mostram a relevância de se estudar produtos naturais oriundos de venenos animais, uma vez que novas moléculas foram descobertas a partir dos venenos das vespas estudadas, mostrando a riqueza e diversidade desses compostos.

PALAVRAS CHAVE: Peptidômica, Veneno de Vespas, Peptídeos, Espectrometria de Massas

ABSTRACT

Peptides have an important role on physiologic functions of animals, plants and microorganisms. These natural peptides frequently are candidates for new drugs natural, and are used as models for the construction of modified peptides in order to improve their pharmacological activities. From academic point of view, social wasp venoms are interesting once they are rich in policationic and polifunctional peptides that are involved with inflammatory processes (membrane lyses, mast cell degranulation, chemotaxis, and other processes), antimicrobial effects against Gram-positive and Gram-negative bacterias. Therefore, the main objective of this study was to bioprospect a diversity of peptidic compounds from the venoms of the neotropical social wasps *Agelaia pallipes pallipes* and *Agelaia vicina* through peptidomic analysis, identifying and characterizing these molecules structurally and functionally. For that, the venom from both wasps was extracted in MeCN 50% (v/v), analyzed and sequenced by ESI-MS, ESI-MSⁿ. All characterized peptides were manually synthesized by Fmoc strategy and used for pharmacological and physiological activities. This work has reached the initially proposed objectives by the identification and functional characterization of twelve peptides from the social wasps venoms studied. Of these identified molecules, nine were isolated from the social wasp *A. p. pallipes* venom (Protonectin (1-4)-OH, Protonectin (1-5)-OH, Protonectin (1-6)-OH, Protonectin (7-12); *Agelaia* MP-I, *Agelaia* MP-II, Pallipin-I, Pallipin-II, and Pallipin-III), and from the venom of the social wasp *A. vicina*, four peptides were characterized (Protonectin (7-9)-OH, Protonectin, Protonectin (1-6), and *Agelaia* MP-I). These results show that the venom of both wasps are very similar to each other, probably due to the kinship of such species. Functionally, the peptide protonectin is lytic to erythrocytes, leukocyte degranulator, PMNL chemotactic, hyperalgesic, and edematogenic; the peptide Protonectin (1-4)-OH is lytic to erythrocytes, and leukocyte degranulator; the peptide Protonectin (1-5) OH is chemotactic and hyperalgesic; the peptide Protonectin (1-6)-OH is only chemotactic; the peptide Protonectin (1-6) is chemotactic and hyperalgesic; the peptide Protonectin (7-12) is only chemotactic; the peptide *Agelaia* MP-I is lytic to erythrocytes, degranulator, and insulin secretion stimulator (the pathway is not yet determined); the peptide *Agelaia* MP-II is lytic to erythrocytes and degranulator but less potent than *Agelaia* MP-I; o peptide Pallipin-II did not show any activity to the present moment, but it is still under characterization, while the peptide Pallipin-III is an insulin secretion inhibitor (the pathway is not yet determined). Moreover, these results show the importance of natural product bioprospection from

animals venoms, once new molecules can be still found, showing the richness and diversity of these compounds.

KEY WORDS: Peptidomics, Wasp Venom, Peptides, Mass Spectrometry

1 INTRODUÇÃO

O termo “Peptidômica” foi introduzido em 2001 (Clynen et al 2001), e é definido como a tecnologia para a descrição qualitativa e quantitativa de peptídeos de uma determinada amostra biológica (Schulz-Knappe et al 2001), compreendendo o estudo de todos os peptídeos expressos por uma célula, órgão ou organismo (Clynen et al 2003). Os peptídeos são ferramentas de pesquisa indispensáveis em ciências da vida, sendo frequentemente candidatos a novas drogas na sua forma natural ou para o “desenho” de peptídeos modificados, e mudanças mínimas em suas estruturas primárias podem alterar dramaticamente a afinidade e seletividade aos alvos (Adermann et al 2004).

Os produtos naturais como os peptídeos são, frequentemente, o ponto de partida para pesquisas de novas drogas (Kobayashi et al 1992). No ano de 2007, a NPS Pharmaceuticals, Inc. anunciou a venda dos “royalties” do hormônio paratireoideano Preotact® (PTH 1-84] por \$50 milhões à Drug Royalty L.P. 3 (DRC) (<http://www.npsp.com>). O gigantesco potencial das moléculas presentes nos venenos de artrópodes já são explorado por várias empresas particulares, como no caso do acordo de 50 milhões de dólares americanos, firmado, em 1992, entre a Pfizer, Inc. e a Neurogen Corp. para a pesquisa de drogas para o tratamento da ansiedade. Além disso, a Pfizer, Inc. também firmou um acordo com a Natural Product Sciences, Inc. para a pesquisa de compostos baseados em venenos de aranhas, com o intuito de desenvolver drogas para terapia de distúrbios neuropsiquiátricos e derrames (Bernstein 1992). No ano seguinte, a NPS Pharmaceuticals Inc., assinou um contrato com uma agência científica de Madagascar para a investigação dos usos medicinais de compostos-líderes extraídos de toxinas encontradas em insetos venenosos e aracnídeos (Garcia 1993).

E porque estudar os venenos de artrópodes? Os insetos, juntamente com os crustáceos, milípedes e outros artrópodes, compõem cerca de 70% das espécies existentes no planeta, sendo que os membros da Classe Insecta, sozinhos, possuem diversidade maior que qualquer outro animal terrestre já descrito até os dias hoje. Os insetos possuem uma incrível capacidade de adaptação podendo ser pragas de lavouras, “pragas urbanas” e vetores de doenças (Meinwald 2000). Entretanto, esses animais também são necessários na polinização de muitas espécies de valor econômico para a agricultura e exportação de produtos derivados da produção de mel, além de serem predadores naturais de outros insetos, fontes de veneno com valor terapêutico, entre outras características (Gillaspy 1982, In: Breed et al 1982).

Um dos maiores motivos para o sucesso deste grupo animal, além das características morfológicas, é o fato de possuírem um vasto arsenal químico existente em seus venenos e secreções corpóreas, que é utilizado na defesa contra predadores. Em geral, os insetos também possuem a capacidade de metabolizar compostos orgânicos oriundos de plantas, que são adquiridos por meio de sua dieta alimentar e tornam-se potencialmente úteis no mecanismo de defesa desses organismos (Meinwald 2000). Os insetos são, portanto, verdadeiros “químicos orgânicos” capazes de controlar os gastos energéticos relacionados à produção e utilização de suas secreções químicas utilizadas como ferramentas de caça e defesa, outra característica importante que também garantiu o sucesso desse grupo de animais (Wigger et al 2002, King 2004).

Mas, mesmo convivendo com os seres humanos desde a época dos hebreus, gregos e egípcios (WILSON 1982 In: BREED et al 1982), somente dezenove séculos após o início da Era Cristã (ou Era Comum), os venenos desses animais despertaram o interesse de pesquisadores (Spradbery 1973).

Mais de 200.000 espécies de vespas, abelhas e formigas formam a Ordem Hymenoptera (Edery et al 1978). E, dentre esses, as vespas sociais se destacam como importantes causadores de acidentes de envenenamento significativos. As diferentes espécies de vespas sociais reagem diferentemente aos acontecimentos ao redor de seus ninhos e tendem a atacar os intrusos que se aproximam (Edery et al 1978), injetando seu veneno por meio de ferroadas seguidas. Dessa forma, esses acidentes envolvem reações diversas, tais como: dores prolongadas, edema, eritema local, urticária, ulceração, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, tonturas, taquicardia, diarreia, perda dos reflexos, reações alérgicas e até mesmo anafilaxia (Habermann 1972, Edery et al 1978, Oliveira 2000, Lorenzi 2002, Park 2002).

A dor pode continuar por várias horas e a ardência por alguns dias. Observou-se experimentalmente que a liberação de histamina a partir da desgranulação de mastócitos e de catecolaminas de células adrenais; pode-se ainda observar citólise, hemólise e quimiotaxia de macrófagos e de outros leucócitos polimorfonucleares para o local da ferroadada (Habermann 1972, Edery et al 1978, Oliveira 2000, Lorenzi 2002, Park 2002). E, dentre os diversos compostos causadores de tantos sintomas diferentes, destacam-se os componentes peptídicos policatiônicos que apresentam diversas atividades como citólise, hemólise, desgranulação de mastócitos, quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares e antibiose (Nakajima 1986).

As pesquisas realizadas até o momento sobre a estrutura, atividade biológica e

mecanismos de ação do veneno bruto e/ou toxinas isoladas dos venenos de Hymenoptera sociais, evidenciam a presença de efeitos importantes sob o ponto de vista médico, farmacológico, fisiológico e imunológico, desencadeados pelas toxinas de tais venenos (Oliveira 2000). A grande maioria das mortes causadas por ferroadas de Hymenoptera sociais está diretamente relacionada ao desencadeamento de reações imunológicas, porém algumas se devem à toxicidade direta do veneno (Castro e Palma 2009).

Porém, mesmo conhecendo os venenos de Hymenopteros desde o século XIX e sabendo que um grande número de espécies de vespas sociais ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, ainda é necessário um estudo mais aprofundado sobre a composição dos venenos destes insetos, especialmente os neotropicais (Palma e Braga 1994). Dessa forma, esse conhecimento toxinológico favorecerá, cada vez mais, o desenvolvimento de tratamentos apropriados para se administrar o cuidado apropriado com as vítimas de ferroadas por esses animais.

Tendo isso em vista, o estudo dos venenos dos Hymenoptera, em especial, das vespas sociais neotropicais, se torna interessante sob o ponto de vista da grande variedade de moléculas peptídicas produzidas nos venenos desses animais. Além disso, a investigação desses componentes seguido do aprofundamento dos conhecimentos sobre a relação estrutura/função dos componentes já identificados, certamente contribuirá para a expansão de nossos conhecimentos sobre a bioquímica, fisiologia e farmacologia dos venenos de Hymenoptera sociais, permitindo um cuidado mais adequado às vítimas ferroadas por estes insetos.

2 OS CONSTITUINTES DOS VENENOS DE HYMENOPTERA

Os constituintes dos venenos de Hymenoptera têm sido bem documentados para a maioria das vespas sociais endêmicas de clima frio (Nakajima et al 1986). Os mesmos contêm vários tipos de aminas biogênicas (<1kDa), peptídeos (1kDa à 10kDa) e proteínas (>10kDa), incluindo algumas hidrolases (como as fosfolipases, proteases, hialuronidases, fosfatases e nucleotidasas) (Nakajima et al 1986, Mendes et al 2004b).

Dentre essa grande diversidade de toxinas, os compostos peptídicos destacam-se pela grande variedade de funções descritas. Isso se deve provavelmente, ao tamanho intermediário dessas toxinas (em relação aos demais tipos de compostos encontrados nos venenos de vespas). Essas moléculas interagem com diversos tipos celulares e tecidos causando diversas reações tais como: dores prolongadas, aumento da pressão arterial, contração da musculatura, lise celular, desgranulação de mastócitos e outras células granuladas, quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares, atividades neurológicas, antibiose entre outras atividades.

2.1 Compostos Peptídicos

Ainda hoje, trabalhos agrupam os peptídeos a partir de sua característica mais marcante, como será visto nos capítulos subseqüentes. Porém, como também será mostrado posteriormente, um mesmo peptídeo pode apresentar mais de um tipo de atividade biológica destes peptídeos.

Isso é devido à composição dos resíduos de aminoácidos que compõem cada cadeia peptídica e, conseqüentemente, ao tipo de estrutura secundária assumido por essa molécula, uma vez que a grande maioria desses peptídeos é de natureza policatiônica. Ainda assim, apesar dessas considerações, decidiu-se manter a classificação tradicional, onde os compostos peptídicos são atualmente classificados como:

- (1) Cininas (Pisano 1968, Toki et al 1988);
 - (2) Mastoparanos (Hirai et al 1978, Toki et al 1988);
 - (3) Quimiotáticos (Toki et al 1988);
 - (4) Neuroativos (Harvey et al 1993);
 - (5) Antibióticos (Park et al 1995);
 - (6) Outras atividades
-

2.1.1 As Cininas

Diversas cininas de vespas sociais foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente. No entanto, suas propriedades farmacológicas ainda não foram completamente investigadas devido às baixas concentrações destes peptídeos na grande maioria dos venenos das vespas sociais. Essas moléculas têm sido associadas com dores prolongadas, aumento da pressão arterial, e contração da musculatura lisa (Nakajima 1986). Na tabela 1 estão apresentadas cininas já identificadas nos venenos de vespas.

TABELA 1: Sequência primária de cininas isoladas dos venenos de vespas.

Espécie de Vespas	Nomes dos Peptídeos	Sequência Primária	N-term
<i>Polistes</i>	Polistescinina-3	P E T N K K K L R G R P P G F S P F R	NH ₂
<i>Polistes</i>	Polistescinina-R	A R R P P G F T P F R	NH ₂
<i>Polistes</i>	Polistescinina-J	R R R P P G F S P F R	NH ₂
<i>Polistes</i>	Polistescinina-C	S K R P P G F S P F R	NH ₂
<i>Polistes</i>	Polistes-protonectina	I L S A L L G L L K S L	NH ₂
<i>Protopolybia exigua</i>	Polybiacinina-I	D K N K K P I R V G G R R P P G F T P E R	OH
<i>Protopolybia exigua</i>	Polybiacinina-II	D K N K K P I W M A G F P G F T P I R	OH
<i>Vespa</i>	Vespacinina-M	G R P X G F S P F R I D	NH ₂
<i>Vespa</i>	Vespacinina-X	A R P P G F S P F R I V	NH ₂
<i>Vespa</i>	Vespacinina-A	G R P P G F S P F R V I	NH ₂
<i>Vespa</i>	Vespacinina-T	G R P X G F S P F R V V	NH ₂
<i>Chiphononix fulvognathus</i>	Thr6-Bradicinina	R P P G F T P F R	NH ₂
<i>Chiphononix fulvognathus</i>	Fulvocinina	S I V L R G K A P F R	NH ₂
<i>Chiphononix fulvognathus</i>	Cyphoscinina	D T R P P G F T P F R	NH ₂

Referências: Kishimura et al 1976, Mendes e Palma 2006, Murata et al 2006, Nakajima et al 1986, Picolo et al 2004, Rocha e Silva et al 1949, Ueno et al 1977, Udenfriend et al 1967, Yasuhara et al 1977, Yasuhara et al 1983, Watanabe et al 1976.

Algumas cininas possuem parte de suas sequências primárias altamente conservadas em relação à bradicinina (cuja sequência é RPPGFSPFR-OH), com algumas exceções, onde ocorre uma substituição dos resíduos de aminoácidos das posições três e seis na sequência da bradicinina (Nakajima 1986).

Um exemplo ocorre no caso de dois peptídeos isolados e caracterizados do veneno da vespa social *Protopolybia exigua*. São eles a Protopolybiacinina-I, causadora da constrição de músculos do íleo, de maneira menos potente quando comparada com a bradicinina; indutora da desgranulação de mastócitos (sete vezes mais potente que a causada pela bradicinina) e responsável pela dor seguida da ativação direta de receptores B₂; e a Protopolybiacinina-II, com função desgranuladora de mastócitos (dez vezes mais potente que a causada pela bradicinina), exercendo pequenos efeitos constritores sobre o

músculo íleo. Ambos os peptídeos possuem a sequência da bradicinina conservada “no interior” de cadeia polipeptídica, enquanto que os resíduos de aminoácidos das regiões N- e C-terminais estariam associados com a proteção da sequência principal, contra ação de proteases (Mendes e Palma 2006).

Outras cininas são encontradas nos venenos de vespas do gênero *Polistes*, onde o resíduo de serina da posição seis é substituído pelo da treonina, apresentando uma grande semelhança com a plasmacina de tartarugas (Dunn e Parks 1970). Griesbacher et al (1998) encontraram bradicina e Thr⁶-bradicinina nos venenos das vespas sociais *Vespula vulgaris*; *Vespa analis* e *Vespa tropica* (Gobbo et al 1995). A bradicinina também foi encontrada nos venenos de vespas solitárias *Megacampsomeris prismática* e a Thr⁶-bradicinina em *Campsomeriella annulata annulata* e *Carinoscolia melanosoma fascinata* (Konno et al 2002).

Também existem cininas encontradas no veneno de vespas do gênero *Vespa*, denominados Vespacina-M, Vespacina-A, Vespacina-X e Vespacina-T, nas quais ocorre a substituição do resíduo de prolina da posição três por hidroxiprolina, sendo desta forma, análogas à bradicinina encontrada na pele do anfíbio *Heleophryne depressa* (Nakajima et al 1979).

2.1.2 Os Mastoparanos

Os componentes peptídicos mais abundantes e mais estudados nos venenos das vespas são aqueles pertencentes à classe dos mastoparanos (Piek 1986). Trata-se de um peptídeo anfifílico com conformação em hélice- α composto de 10 a 14 resíduos de aminoácidos sem nenhuma cisteína em sua sequência primária (Nakajima et al 1986; Mendes et al 2005). Os mastoparanos também possuem resíduos de lisina em suas cadeias que tem, como possível função, a facilitação da liberação de histamina de mastócitos (Higashima et al 1990). Na tabela 2 estão apresentados as sequências primárias de peptídeos mastoparanos isolados dos venenos de vespas.

Esses peptídeos policatiônicos estão envolvidos na ocorrência de inflamações, incluindo lise de membranas celulares, desgranulação de mastócitos (sua principal característica funcional), liberação histamínica e conseqüente vasodilatação; indução de quimiotaxia de neutrófilos e células *T helper*, resultando no recrutamento de outros leucócitos para o local inflamado (Hancock e Diamond 2000).

TABELA 2: Sequência primária dos peptídeos mastoparanos isolados dos venenos de vespas.

Espécie de Vespas	Peptídeos	Sequência Primária	N-term
<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	App-5	INWKAILERIKMA	NH ₂
	App-7	INWLKLGKAIIDA	NH ₂
	Protonectina	ILGTILLKGL	NH ₂
	Agelaia MP-I	INWLKLGKAIIDAL	NH ₂
<i>Anoplius samariensis</i> *	Anopline	GLLKRIKTLL	NH ₂
<i>Anterchium flavomarginatum micado</i> *	EMP-AF	INLLKIAKGIKSL	NH ₂
	EMP-AF 1	INLLKIAKGIKSL	OH
	EMP-AF2	LKIAKGIKSL	OH
	EMP-AF3	LKIAKGIISL	OH
<i>Apoica pallens</i>	Apoica-MP	INWLKIAKKVAGML	NH ₂
<i>Eumenes rubronotatus</i> *	EMP-ER	LNKLGIFKKVASLLT	NH ₂
<i>Orancistroceros drewseni</i> *	Od-6	GRILSFIKGLAEHL	NH ₂
	Od-8	ILGIIWSLLKSL	NH ₂
<i>Parapolibia indica</i>	Parapolibia-MP	INWKKMAATALKMI	NH ₂
<i>Polistes jadvigae</i>	Polistes MP	VDWKKIGQHILSVL	NH ₂
<i>Polistes dominulus</i>	Domilina A	INWKKIAEVGGKILSSL	NH ₂
	Dominila B	INWKKIAEIGKQVLSAL	NH ₂
<i>Polybia paulista</i>	Polybia-MPI	IDWKKLLDAAKQIL	NH ₂
	Polybia-MPII	INWLKLGKVIDAL	NH ₂
	Polybia-MPIII	IDWLKLGKVMVDVL	NH ₂
	Polybine I	SADIVKKLWDNPAL	NH ₂
	Polybine II	SVDMVMKGIKLWPL	NH ₂
<i>Protonectarina sylveirae</i>	Protonectarina-MP	INWKALLDAAKKVL	NH ₂
<i>Protopolybia exígua</i>	Protopolybia MPI	INWLKLGKVSAIL	NH ₂
	Protopolybia MPII	INWKAIEAAKQAL	NH ₂
	Protopolybia MPIII	INWLKLGKAVIDAL	NH ₂
<i>Rodopalia SP</i>	Rodopalia MP	INWAKLGKLALQAL	NH ₂
<i>Synoeca cyanea</i>	SC-4	INWLKLGZKIISAL	NH ₂
<i>Vespa analis</i>	Mastoparano-A	IKWAILDVKKVL	NH ₂
<i>Vespa basalis</i>	Mastoparano-B	LKLSIESWAKKVL	NH ₂
	HP-1	LFRLIAKTLGSLM	NH ₂
	HP-2	LFRLANTLKGIL	NH ₂
	HP-3	IFGLLAKTLGNLF	NH ₂
<i>Vespa cabro</i>	Mastoparano-C	INWKALLAVAKKIL	NH ₂
<i>Vespula lewisii</i>	Mastoparano	INLKALAALAKKIL	NH ₂
<i>Vespa mandarina</i>	Mastoparano-M	INLKAI AALAKKLL	NH ₂
<i>Vespa orientalis</i>	HR-I	INLKALAALVKKVL	NH ₂
	HR-II	FLPLILGKLVKGLL	NH ₂
	Mastoparano-II	INLKALLAVAKKIL	NH ₂
<i>Vespa tropica</i>	Mastoparano-T	INLKAI AAFKAKKIL	NH ₂
<i>Vespa xanthoptera</i>	Mastoparano-X	INWKGIAAMAKKLL	NH ₂

* Vespas solitárias **Referências:** Argiolas e Pisano 1984a, Chuang et al 1996, De Souza e Palma 2008, De Souza et al 2004, 2005, Dohtsu et al 1993, Hirai et al 1979a, 1979b, Ho e Hwang 1991, Ho et al 1998, Konno et al 1998, 2000, 2006, Mayo et al 2000, Mendes et al 2004, 2005, Murata et al 2008, Nakajima 1986, Nazimov et al 1980, Ribeiro et al 2004, Tuichibaev et al 1988, Turillazzi et al 2006, Yasuhara et al 1983.

Segundo Park et al (1995), esses peptídeos também apresentam várias atividades biológicas, podendo agir como um potente agente promotor de exocitose de diversas células de mamíferos, causar a secreção de histamina de mastócitos, mesmo em baixas concentrações (3×10^{-7} M) (Nakajima 1986), e de promover a liberação de serotonina à partir de plaquetas e de prolactina a partir da glândula pituitária anterior (Hirai et al 1979a, Kuroda et al 1980). Podem ainda, apresentar atividade hemolítica, como é o caso do Mastoparano-X, isolado do veneno de *Vespa xanthoptera* (em concentração de 4×10^{-6} M) (Hirai et al 1979b), e do Mastoparano-B, isolado do veneno da *Vespa basalis* (Ho e Hwang 1991). O Mastoparano-B presente no veneno de *Vespa basalis* participa das atividades hemolítica e de formação de edema, além de provocar falência cardiovascular, devido a uma excessiva liberação de íons potássio eritrocitários, induzida pela toxina (Ho et al 1994).

Segundo Mousli et al (1990), os peptídeos desgranuladores de mastócitos são uma família de peptídeos anfifílicos policatiônicos, que também incluem neuropeptídeos, e hormônios. A interação destes peptídeos com os fosfolípidos pode causar perturbações na organização estrutural das membranas, ou mesmo podem se ligar a receptores específicos acopladas às proteínas-G nas membranas plasmáticas, ativando o mecanismo de transdução de sinal, que envolve a troca GTP/GDP.

Na presença de íons Mg^{+2} , a subunidade α ligada ao GTP se dissociaria do complexo da subunidade $\beta\gamma$; uma dessas subunidades, ou ambas, reagiria com os efetores (canais iônicos ou enzimáticos). A hidrólise de GTP a GDP permitiria a recombinação de α -GDP com $\beta\gamma$, finalizando a ativação cíclica (Mousli et al 1990).

Ainda segundo este autor, o primeiro contato entre o peptídeo e as membranas lipídicas parece estar relacionado com a presença de sítios positivos na molécula do peptídeo, que podem interagir com sítios negativos (como exemplo: ácido siálico) presentes na membrana dos mastócitos. Após esta ligação, o peptídeo interage com componentes da membrana, promovendo a ativação de proteínas G.

No caso da liberação de histamina, o efeito do mastoparano é seguido de um aumento na concentração de íons Ca^{2+} citoplasmáticos, que por sua vez induzem um aumento de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP-3), um mensageiro secundário intracelular. Essa liberação de histamina induzida pelo mastoparano parece ser mediada por interações deste peptídeo com a subunidade β da proteína G (Habermann 1972). Segundo Ross e Higashijima (1994), esta ativação é causada por fosforilação, mediada pela conversão de GTP em GDP.

Experimentos realizados por Okumura et al (1981) mostraram que os mastoparanos interagem com membranas lipídicas artificiais compostas de lecitina e colesterol, aumentando a permeabilidade iônica e, deste modo, aumentando também a condutividade da membrana. Este aumento na permeabilidade dos canais iônicos pode ser a causa primária do efeito de liberação de mediadores da ativação celular, uma vez que os mesmos requerem um aumento no influxo de íons Ca^{2+} para promover a excitação celular (Nakajima 1986).

No ano de 1979, Hirai e colaboradores identificaram e caracterizaram o primeiro mastoparano a partir do veneno da vespa social *Vespula lewisii*. Este peptídeo, composto basicamente de lisina e aminoácidos hidrofóbicos, foi o primeiro exemplo de peptídeo desgranulador de mastócitos isolado do veneno de vespas. A sequência primária dos mastoparanos assemelha-se muito à da Bombinina, um peptídeo hemolítico isolado da pele do sapo *Bombina variegata* (Csordàs e Michl 1970).

Mais tarde, em 1988, Higashima e colaboradores relacionaram a interação existente entre o Mastoparano isolado da *V. lewisii* e proteínas-G, onde descrevem que este se liga aos fosfolípidios de membrana, formando uma estrutura em hélice- α com cargas positivas, de maneira ordenada na superfície da membrana, salientando a característica de acoplamento entre os mastoparanos e as proteínas-G.

Mizuno et al (1998) demonstraram que o Mastoparano causa a liberação de histamina das células RBL-2H3, sem ser inibido pela toxina Pertussis, sugerindo a existência de um mecanismo de liberação de histamina, diferente da desgranulação mediada por receptores acoplados às proteínas-G para as células RBL-2H3. Neste caso, o Mastoparano aumentaria a permeabilidade da membrana das células RBL-2H3, induzindo o extravasamento da enzima Lactato Desidrogenase (LDH), ou seja, ele induz a liberação de histamina através da lise da membrana celular, e conseqüente ruptura dos grânulos dos mastócitos.

O Mastoparano pode, ainda, ser considerado um peptídeo versátil, porém pouco seletivo, uma vez que ele é capaz de interagir com diversos componentes de membranas biológicas, sendo capaz de interagir com diversos tipos celulares como mastócitos (Hirai et al 1979), neutrófilos (Perianin e Anyderman 1989), células pituitárias (Kurihara et al 1986), adrenais (Wilson 1989), plaquetárias (Ozaki et al 1990), alveolares (Joyce-Brandy et al 1991), linhagens RINm5F (linhagens tumorais de células beta) (Hillaire-Buys et al 1992) e PC-12 (linhagens de células derivadas de um feocromocitoma da medula supra-renal) (Choi et al 1992), e células pancreáticas (Yokokawa et al 1989, Komatsu et al 1992, Jones

et al 1993), promovendo a secreção de seus conteúdos.

Entre os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta secretória dessas células, o Mastoparano facilita a atividade fosfolipásica (PL) dos tipos A₂ (Argiolas e Pisano 1983, Joyce-Brandy et al 1991, Komatsu et al 1992, Gil et al 1991) e C (Okano et al 1985, Mousli et al 1989, Perianin e Anyderman 1989, Choi et al 1992, Wallace e Carter 1989, Gusovsky et al 1991). Esse peptídeo reduz a separação de polifosfoinosítídeos pela supressão da PLC ou pela interação direta do peptídeo com os polifosfoinosítídeos (Nakahata et al 1989, Wojcikiewicz e Nahorski 1989, Eddlestone et al 1995).

O Mastoparano também pode estimular (Weeler-Jones et al 1992) ou suprimir (Joyce-Brandy et al 1991, Nakahata 1989) a atividade da adenilato ciclase uma vez que ele se liga à calmodulina (na proporção estequiométrica de 1:1) (Malencik e Anderson 1983, Barnette et al 1983). Outra ação referente a este peptídeo é a capacidade de aumentar a síntese de DNA, melhorando a troca de nucleotídeos de proteínas G heterotriméricas e de baixas massas moleculares (Gil et al 1991, Mousli et al 1989, Higashijima et al 1988, Higashijima e Ross 1991, Eddlestone et al 1995). Ainda, este peptídeo pode apresentar-se como lítico (Hirai et al 1979, Kuriha et al 1986, Tanimura et al 1991, Katsu et al 1990).

Especificamente no caso da secreção de células β , o Mastoparano é o mais estudado, sendo caracterizado como estimulador da secreção de insulina (Daniel et al 2002), uma vez que este promove o aumento da concentração de Ca²⁺ livre pela inibição dos canais de K_{ATP} (Eddlestone et al 1995).

Konno et al (2000) isolaram o eumenine mastoparano-AE (EMP-AF) da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*, que difere dos demais mastoparanos descritos por ter os resíduos de lisina localizados nas posições 5, 8 e 12 ao invés das posições 4, 11 e 12 como ocorre nos demais. Este peptídeo foi considerado como o principal componente peptídico do veneno desta vespa, com atividade hemolítica e inflamatória proporcional à do Mastoparano, extraído do veneno da *Vespula lewisii*, e atividade mais intensa que o Anoplin (Konno et al 2000). Além da estrutura primária semelhante à dos mastoparanos isolados do veneno de vespas sociais, o EMP-AF possui ainda atividades biológicas similares às dos mastoparanos clássicos.

Em seguida, Park e colaboradores (1994) publicaram um estudo sobre a interação do Mastoparano-B com fosfolípidios de membrana. Concluiu-se que a interação do resíduo de Lys² no Mastoparano-B e o grupo ácido da cabeça lipídica possuem importante papel na estabilização da estrutura em α -hélice. Estudos específicos realizados pelos autores supracitados evidenciaram que o Mastoparano-B induz a desestabilização da bicamada

lipídica; por meio da interação com fosfolipídios de membrana. Cerca de três ou quatro resíduos de Lisina são expostos à fase aquosa, enquanto a parte hidrofóbica da molécula penetra profundamente por entre as camadas lipídicas. Isso faz com que as moléculas de peptídeos se acumulem predominantemente na metade exterior da bicamada, causando a desestabilização das cadeias alquílicas nos lipídeos da bicamada em lipossomos neutros, permitindo que os peptídeos penetrem rapidamente por entre a membrana. Por outro lado, em lipossomos acídicos, a interação entre as cargas do peptídeo catiônico com o lipídio aniônico inibe a penetração profunda dos peptídeos para o outro lado da bicamada.

Esses experimentos realizados (Park et al 1994), também mostraram que os mastoparanos (MP e MP-B) apresentam alta atividade antibióticas. O MP-B apresentou pronunciada atividade antibiótica, tanto contra bactérias Gram-positivas (como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), quanto para bactérias Gram-negativas (como *E. coli* e *Shigella sonnei*). Já o MP apresentou atividade acentuada apenas contra as bactérias Gram-positivas. Segundo esses mesmos autores, essas características provavelmente devem-se as características anfífilas dessas moléculas.

Park et al (1994) demonstraram ainda, que a introdução de aminoácidos básicos, como Lys, na parte hidrofóbica da molécula promove aumento na atividade contra bactérias Gram-negativas, acompanhada de uma drástica redução na atividade contra as Gram-positivas. Por outro lado, quando resíduos de Lys são incorporados na porção hidrofílica da sequência peptídica, observa-se diminuição no efeito antibacteriano destes peptídeos.

Dois anos mais tarde, Ho et al (1996) propuseram que, aparentemente, a Lys² e o Trp⁹ são os resíduos críticos para a produção da atividade hemolítica do Mastoparano-B e essa única estrutura provavelmente pode ser importante para sua maior atividade hemolítica. O Mastoparano-B é liberador de histamina de mastócitos, potente agente hemolítico de células vermelhas, ativador da proteína-G, além de agir em sinergia com a “proteína letal” (outra proteína do veneno do vespão) (Higashijima et al 1988, Park et al 1995, Ho et al 1994, Ho et al 1996). Estudos anteriores, sobre a relação entre estrutura e atividade dos mastoparanos, revelaram o importante papel dos três primeiros resíduos de aminoácidos no influxo de Ca⁺², na afinidade aos lipossomos ou na inibição da sensibilidade à calmodulina (Nakajima et al 1986).

Wakamatsu et al (1983) descreveram que, pela análise de dicroísmo circular, a conformação das moléculas de Mastoparano-X, como ligantes de vesículas de fosfatidilcolina, é altamente α -helicoidais. Entretanto, a conformação do mastoparano

associado às micelas de lisofosfatidilcolina não é exatamente a mesma que da molécula de mastoparano associado às vesículas de fosfatidilcolina. Visto que as atividades biológicas dos peptídeos estão correlacionadas com as conformações de suas moléculas, os autores propõem que é mais importante analisar a conformação dos peptídeos como ligantes da bicamada fosfolipídica, do que das micelas.

Outro peptídeo extraído do veneno de vespa solitária é o Anopline, extraído do veneno de *Anoplius samariensis* (Konno et al 1998). Trata-se de um peptídeo rico em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, também com sequência primária similar aos mastoparanos, principalmente a do Mastoparano-X e Crabrolina, são degranuladores de mastócitos, isolados do veneno de *Vespa xanthoptera* (Krishnakumari e Nagaraj 1997) e *Vespa crabro* (Argiolas e Pisano 1984a), respectivamente. Constatou-se que a atividade antibiótica do Anopline, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pode ser considerada de grande importância no processo de preservação das presas desses animais e contra infecções (Konno et al 2001).

Argiolas e Pisano (1983) estudaram a semelhança entre a Melitina (peptídeo isolado do veneno de abelha) e o Mastoparano (peptídeo isolado do veneno de vespa), no sentido que ambos são capazes de estimular a fosfolipase A_2 . Enquanto a Melitina interage com os fosfolipídios de membrana, o Mastoparano interage com receptor de membrana acoplado à proteína G, promovendo por sua vez a desgranulação de mastócitos. Esses grânulos liberam, entre outras substâncias, prostaglandinas e leucotrienos, que por sua vez, agiriam com os fosfolipídios de membrana em interação com as fosfolipases. Estes autores relataram em 1984(a), que o Mastoparano também é potente ativador de fosfolipase- A_2 e -C, causando um aumento na produção de ácido araquidônico.

Peptídeos similares, como a Crabrolina e os HR-I e HR-II, foram isolados de *Vespa crabro* e *Vespa orientalis*, respectivamente (Nakajima et al 1986). A Crabrolina, assim como o Mastoparano, é um estimulador da fosfolipase A_2 e causa liberação de histamina de mastócitos peritoniais, porém seu modo de ação difere dos mastoparanos clássicos (Argiolas e Pisano 1984a).

Os mastoparanos HR-I e o HR-II, isolados de *Vespa orientalis* (Tuichibaev et al 1988), ocorrem em concentrações muito menores que a Crabrolina, isolada do veneno de *Vespa crabro* (Argiolas e Pisano 1984b). Ambos também causam hemólise e liberação de histamina de mastócitos peritoniais.

Neste mesmo ano, Argiolas e Pisano (1984b), também descreveram as Bombolitinas (I, II, III, IV e V), como sendo heptadecapeptídeos com aminoácidos

hidrofóbicos, que apresentam cargas positivas em pH neutro, sendo peptídeos aparentemente anfífilos por possuírem segmentos em α -hélice. Similares aos mastoparanos em sua sequência primária e semelhantes funcionalmente à Melitina e à Crabrolina por facilitarem a atividade da fosfolipase A_2 .

No veneno da vespa social neotropical *Protopolybia exígua* (Saussure), Mendes e colaboradores (2005) descreveram três novos mastoparanos: o Protopolybia-MPI, hemolítico e causador de perturbações na membrana, enquanto que Protopolybia-MPII e a Protopolybia-MPIII, não apresentaram atividade hemolítica e parecem estar relacionados com a desgranulação de mastócitos ativada pela ligação destes peptídeos a receptores de membrana acoplados a proteínas-G (subunidade G_i), que por sua vez ativa uma cascata de eventos moleculares regulados por AMPc, resultando na desgranulação dos mastócitos.

De Souza et al (2005) caracterizaram um novo mastoparano (Polybia-MPI) no veneno da vespa social *Polybia paulista*, que possui grande similaridade com a Protonectarina-MP, com reduzida atividade desgranuladora de mastócitos (quando comparada a Protonectarina-MP), causando lise em 50% dos mastócitos. Este peptídeo não induz atividade hemolítica sugerindo uma baixa interação com membranas de células eritrocitárias de ratos.

2.1.3 Os Peptídeos Quimiotáticos

Os peptídeos quimiotáticos encontrados nos venenos de vespas são chamados de Ves-CPs ("peptídeos quimiotáticos de vespas"). Suas sequências primárias assemelham-se às dos mastoparanos, apresentando abundância de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Com poucas exceções, possuem conformação em hélice anfipática, na qual todos os resíduos hidrofóbicos estão localizados em uma mesma porção da molécula, enquanto que resíduos básicos como Arg e Lys aparecem na porção oposta (Nakajima 1986). A tabela 3 lista os diversos peptídeos quimiotáticos dos venenos de vespas.

Esses peptídeos induzem a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares e foram inicialmente encontrados nos venenos das espécies *Vespa tropica*, *V. mandarinia*, *V. analis*, *V. cabro*, *V. xanthoptera*, *V. orientalis*, *Paravespula lewisii*, *Icaria sp* (NAGASHIMA et al., 1990). No entanto, outros peptídeos com essas características foram isolados dos venenos das vespas como a *Agelaia pallipes pallipes*, *Protonectina silveirae*, *Polybia paulista*, *Vespa magnífica* e *Polistes rothneyi* iwata (Tabela 3).

TABELA 3: Peptídeos quimiotáticos isolado do veneno de vespas.

Espécie de Vespas	Nomes dos Peptídeos	Sequência Primária	N-term
<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	Protonectina	ILGTILGLLKGL	NH ₂
	Protonecina (1-6)	ILGTIL	NH ₂
<i>Apoica pallens</i>	Apoica MP	INWLKIAKKVAGML	NH ₂
<i>Icaria CP</i>	I-CP	IVPFLGPLLGLLT	NH ₂
<i>Megabombus pensylvanicus</i>	Bombolitina-I	IKITTMLAKLGKVLAVH	NH ₂
	Bombolitina-II	SKITDILAKLGKVLAVH	NH ₂
	Bombolitina-III	IKIMDILAKLGLVLAHV	NH ₂
	Bombolitina-IV	INIKDILAKLVKVLGHV	NH ₂
	Bombolitina-V	INVLGILGLLGKALSHL	NH ₂
<i>Paravespula lewisii</i>	VesCP-L	FLPIIAKLVSGLL	NH ₂
<i>Polistes</i>	Polistescinina-3	PETNKKLRGRPPGFSPFR	NH ₂
	Polistescinina-R	ARRPPGFSPFR	NH ₂
	Polistescinina-J	RRRPPGFSPFR	NH ₂
	Polistescinina-C	SKRPPGFSPFR	NH ₂
	Polistes-Protonectina	ILSALLGLLKSL	NH ₂
<i>Polybia paulista</i>	Polybia-Protonectina	ILGTILGLLKSL	NH ₂
<i>Protonectarina sylveirae</i>	Protonectarina	IAWKALLDAAKKVL	NH ₂
<i>Polybia paulista</i>	Polybia-CP	ILGTILGLLKGL	NH ₂
<i>Protopolybia exígua</i>	Polibiacionina-I	DKNKKPIRVGGRRPPGFSPFR	OH
	Polibiacionina-II	DKNKKPIWMAGFPGFSPFR	OH
<i>Vespa analis</i>	VesCP-A	FLPMIAKLLGGLL	NH ₂
<i>Vespa Cabro</i>	Cabrolina	FLPLILAKIVTAL	NH ₂
<i>Vespa Mandarina</i>	VesCP-M	FLPIIGKLLSGLL	NH ₂
<i>Vespa orientalis</i>	HR-II	FLPLIGKLVKGLL	NH ₂
<i>Vespa tropica</i>	VesCP-T	FLPILGKILGGLL	NH ₂
<i>Vespa xanthoptera</i>	VesCP-X	FLPIIAKLLGGLL	NH ₂
<i>Vespa</i>	Bradicionina	RPPGFSPFR	OH
	Mastoparano	INLKAALAKKIL	NH ₂
	Thr ⁶ -Bradicionina	RPPGFSPFR	NH ₂
	Vespacinina-M	GRPXGFSPFRID	NH ₂
	Vespacinina-X	ARPPGFSPFRIV	NH ₂
	Vespacinina-A	GRPPGFSPFRVI	NH ₂
	Vespacinina-T	GRPXGFSPFRVV	NH ₂

Referências: Argiolas & Pisano 1984, 1985, Baptista-Saidemberg et al 2010; De Souza et al 2005, 2009, Dohtsu et al 1992, 1993, Kishimura et al 1976, Mendes et al 2004, Mendes e Palma 2006, Miroshnikov et al 1981, Murata et al 2006, Nakajima et al 1986, Rocha e Silva et al 1949, Ueno et al 1977, Udenfriend et al 1967, Yasuhata et al 1977, 1983, 1984a, 1984b, Watanabe et al 1976.

Toki et al (1988) isolaram o peptídeo quimiotático “Peptídeo 43” do veneno da vespa *Parapolybia indica*, composto de treze resíduos de aminoácidos, rico em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como Leu ou Ile, com um único resíduo de Lys na 6ª posição, e se diferencia dos demais peptídeos quimiotáticos usuais que se iniciam com a sequência F-L-P e terminam com I-L-NH₂ ou L-L-NH₂. Essa sequência primária com poucas cargas positivas na sequência peptídica contrasta com aquela já conhecida para a

liberação de histamina de mastócitos (Nagashima et al 1990).

De Souza et al (2004) caracterizaram dois novos peptídeos quimiotáticos do veneno da vespa social *Polybia paulista*, que apresentaram atividades hemolíticas, quimiotáticas para leucócitos polimorfonucleares e degranuladora de mastócitos bastante significativas, aparentemente, constituindo uma nova sub-classe destes peptídeos, envolvidos diretamente a ocorrência de processos inflamatórios.

Também foi caracterizada estrutural e funcionalmente uma nova toxina peptídica isolada do veneno da vespa social *Polybia paulista*, Polybia-CP, que apresenta reduzida atividade desgranuladora e de lise de mastócitos, como é esperado para a maioria dos peptídeos quimiotáticos dos venenos de vespas. Este peptídeo também apresentou baixa atividade hemolítica em eritrócitos de ratos (De Souza et al 2005).

Já no ano de 2006, Xu et al descreveram estruturalmente três novos peptídeos quimiotáticos do veneno da *Vespa magnifica* denominados 5e (que possui estrutura idêntica ao VESCP-X, encontrado anteriormente no veneno da *Vespa xanthoptera*), 5f e 5g. Mendes et al (2004b) descreveram que o peptídeo Protonectina, previamente observado no veneno da vespa *Protonectarina sylverae* por Dohtsu et al (1993), também foi encontrado no veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*. Esse peptídeo apresentou atividade hemolítica, desgranuladora de mastócitos peritoniais de ratos e quimiotática para leucócitos polimorfonucleares (Mendes et al 2004a,b).

Murata e colaboradores (2006) descreveram o peptídeo Polistes-Protonectina isolado do veneno da vespa *Polistes rothneyi iwatai*. Esse peptídeo é um análogo da Protonectina, encontrado nas vespas sociais *Protonectarina sylveire* e *Agelaia pallipes pallipes*. Em sua sequência primária, os resíduos de Gly encontrados na sequência original da Protonectina nas posições 3 e 11, foram substituídos por resíduos de Ser.

Baptista-Saidemberg et al (2010) isolaram, do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, o peptídeo Protonectina (1-6), que, isoladamente, apresentou forte atividade quimiotática para leucócitos polimorfonucleares isolados de ratos. Nesse mesmo trabalho, descreveu-se que, em experimentos *in vitro*, esse peptídeo demonstrou-se capaz de interagir com o peptídeo Protonectina, provavelmente, formando uma supra-estrutura molecular que diminui os efeitos quimio-atraentes causados por ambos os peptídeos. Este resultado demonstra que, de alguma forma, os diferentes componentes presentes nos venenos das vespas sociais também poderiam agir em conjunto para o desenvolvimento dos diferentes sintomas apresentados pelas vítimas acidentadas pela ferroada por esses animais.

2.1.4 Peptídeos Neuroativos

Um grande número de aranhas, escorpiões e vespas possuem uma grande variedade de substâncias neuroativas em seus venenos, capazes de interagir com alvos distintos no sistema nervoso. Uma vez que essas moléculas peptídicas têm sido indicadas como ferramentas para aumentar nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares da neurotransmissão (desde mecanismos das funções neuronais, como a elucidação de canais iônicos ou caracterização das funções dos receptores - Harvey et al 1993), as pesquisas com essas neurotoxinas podem também ser alvo no desenvolvimento de inseticidas naturais e drogas potenciais para o tratamento de neuropatologias (Belleboni et al 2004).

Esses polipeptídeos podem, ainda, ser utilizados como ferramentas relacionados às neurociências, em estudos voltados a relação de como essas neurotoxinas interferem nos mecanismos neuronais com alta afinidade e seletividade. Análises realizadas por Mortari et al (2007) demonstram que essas neurotoxinas se ligam a receptores, transportadores e canais iônicos de neurônios excitatórios e inibitórios no sistema nervoso central de insetos e mamíferos, garantindo a sobrevivência dos invertebrados venenosos.

Devido às propriedades de seletividade e afinidade desses peptídeos (assim como das poliaminas), eles são úteis no 'desenho' de novas drogas para o tratamento de distúrbios neuronais tais como a epilepsia, doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer e isquemia global e retinal. Essas moléculas, adquiridas de diferentes venenos, tiveram suas propriedades caracterizadas para muitos subtipos de canais iônicos bem como para receptores de neurotransmissores (Mortari et al 2007).

As Megascoliacininas, isoladas do veneno da vespa solitária *Megascolia flavifrons*, que bloqueiam receptores nicotínicos para acetilcolina (Yashuara et al 1987, Piek et al 1991, Piek 1991), enquanto que as Pompilodoxinas (α - e β - PMTX) isoladas do veneno da vespa solitária *Anoplius samariensis* (exceto para a PMTX, também isolada do veneno da vespa aranha *Batozonellus malifrons*), possuem ação na facilitação da transmissão neuromuscular de lagostas, porém a α -PMTX tem ação mais rápida que a β -PMTX. Neste último caso, as PMTX's diferem uma da outra pela presença de Arg-12 no lugar de Lys-12, na β -PMTX (Konno et al 1998).

Sahara et al (2000) relataram que a β -PMTX causa atenuação do processo de inativação nos canais de sódio, sensíveis à TTX, de neurônios trigeminais de ratos. Em seguida, Kinoshita et al (2001) determinaram que a β -PMTX exibe uma sensibilidade

específica à isoforma para canais de sódio, dependendo da presença ou ausência de um resíduo aniônico no sítio de ligação, oferecendo diversas vantagens para classificar e caracterizar várias isoformas de canais de sódio (Kinoshita et al 2001). Outros peptídeos com ação no sistema nervoso também foram isolados do veneno da vespa social *Agelaiia vicina*: AvTx8 (Oliveira et al 2005a) e o AdAv3 (Oliveira et al 2005b).

O peptídeo AvTx8 apresentou efeitos similares ao Baclofen® (droga já comercializada, utilizada no tratamento de ansiedade), o peptídeo AvTx8 foi microinjetado no SNpr (Sistema Nervoso Parassimpático) de *Rattus norvegicus* (Wistar) antes das microinjeções salinas de dISC ou bicuculina, considerando que o veneno de vespa possui alguma influência na captação de neurotransmissores GABA e/ou glutamato. O bloqueio do receptor de GABA(A) resultou em um comportamento de fuga vigoroso expresso por corrida rápida, pulos e voltas quando comparado com o controle (Oliveira et al 2005a).

Essas reações defensivas foram maximizadas após o agonismo intranigral de GABA(A) com muscimol, mas não após o agonismo *in situ* de GABA(B). As microinjeções nigrais de AvTx8 induziram efeitos similares ao baclofen, diminuindo a intensidade das reações comportamentais defensivas induzidas pelo bloqueio do receptor GABA(A) no mesencéfalo dorsal. Essas descobertas sugerem que AvTx8 possui alguns efeitos na neurotransmissão GABAérgica, aumentando a atividade das vias inibitórias nigro-coliculares, causando um efeito anti-pânico (antiaversivo). Dessa maneira, foi sugerido que a AvTx8 pode ser uma nova ferramenta farmacológica para o estudo das diferenças entre os dois tipos de receptores GABAérgicos e os mecanismos excitatórios mediados por aminoácidos no cérebro e no sistema nervoso (Oliveira et al 2005a).

Cininas são polipeptídeos de 9-18 resíduos de aminoácidos contendo uma sequência do tipo Bradicinina, em alguns casos como parte da molécula. A sequência do tipo Bradicinina pode ser tanto bradicinina, Hyp³-bradicinina ou Thr⁶-bradicinina. As cininas são componentes neurotóxicos dos venenos de vespas e formigas, causando no sistema nervoso central de insetos um bloqueio pré-sináptico da transmissão colinérgica por meio de uma depleção irreversível, provavelmente causada por uma inibição não competitiva da captação de colina (Piek 1991).

As propriedades farmacológicas dos quatro análogos sintéticos da neurotoxina de vespa Vespulacinina 1 foram estudados através de uma série de preparações de músculo liso de mamíferos e da transmissão sináptica dos nervos cercais de baratas para um interneurônio gigante. Todos os análogos tiveram um efeito do tipo-bradicinina, extremamente baixo nos músculos lisos. Os análogos não glicosilados deste peptídeo e

os dois peptídeos monoglicosilados são aproximadamente tão ativos como a bradicina. Os derivados duplamente glicosilados são aproximadamente cinco vezes mais potentes que a bradicinina e todos os análogos tiveram dois efeitos diferentes na transmissão sináptica no sistema nervoso de insetos: primeiro, um bloqueio direto e reversível na transmissão excitatória nicotínica com uma ativação concorrente do sistema inibitório GABAérgico e segundo, um bloqueio irreversível atrasado da transmissão, comparável ao bloqueio descrito anteriormente para a bradicinina e Thr⁶-bradicinina. Para a transmissão sináptica no SNC de insetos a cinina com duas glicosilações é aproximadamente cinco vezes mais potente do que a bradicinina (Piek et al 1993).

A Orientotoxina (peptídeo isolado da *Vespa orientalis*) foi descrito como sendo um novo composto pressináptico neurotóxico manifestando atividade lisofosfolipase e, espontaneamente, pode tanto bloquear e induzir a liberação de neurotransmissores do nervo pré-sináptico membranar (Tuřchibaev et al 1984).

2.1.5 Peptídeos Antibióticos

No final de 1960, as necessidades médicas por novos antibióticos começaram a ser questionada e a indústria farmacêutica substituiu sua ênfase de antibactericidas a partir de um composto terapêutico líder para áreas de pesquisa de menor prioridade. Embora as doenças infecciosas, em particular àquelas causadas por bactérias, ainda estejam entre as maiores responsáveis pela mortalidade no mundo, o apoio industrial continuou a diminuir. A mudança dessa importante área de pesquisa antimicrobiana foi atribuída a uma combinação de fatores científicos, médicos, e mercadológicos. A diminuição na intensidade de descoberta de drogas antibióticas, juntamente com um crescente risco resultante de infecções causadas por patógenos bacterianos resistentes a drogas representam uma clara ameaça à saúde pública (Overbye e Barrett 2005).

Muitos dos peptídeos encontrados nos venenos desses Hymenopteros possuem entre 13-26 resíduos de aminoácidos podendo, portanto, serem sintetizados quimicamente além de serem facilmente estudados em relação às correlações estrutura-função. E a descoberta de peptídeos como esses nos últimos anos, tem fornecido uma grande quantidade de moléculas que podem ser engenheiradas para obtenção de uma atividade específica (Krishnakumari e Nagaraj 1997). A tabela 4 ilustra peptídeos antimicrobianos isolados dos venenos de vespas.

TABELA 4: Peptídeos antibióticos isolados dos venenos de vespas.

Vespas	Peptídeos	Sequência Primária
<i>Agelais pallipes pallipes</i>	Protonectina	ILGTILGLLKGL
	Mastoparano	
	Mastoparano B	
	EMP-AF	
<i>Vespa magnífica</i>	5a	LLGGLL
<i>Vespa magnífica</i>	5b	FLPIIAK
<i>Vespa magnífica</i>	5c	KLLGGLL
<i>Vespa magnífica</i>	5d	INWKGIAAMKK
<i>Vespa magnífica</i>	5e	FLPIIAKLGGLL
<i>Vespa magnífica</i>	5f	FLPIPRPILLGGLL
<i>Vespa magnífica</i>	5g	FLIIRRPIVLGLL
<i>Vespa magnífica</i>	12a	INWKGIAAMAKKLL
<i>Vespa magnífica</i>	12b	INWKGIAAMKLL
<i>Vespa magnífica</i>	12c	INWGIA
<i>Vespa magnífica</i>	12d	INWKGIAAM
<i>Vespa crabro</i>	Cabrolina	FLPLILKIVTAL

Referências: Dohtsu et al 1993; Xu et al 2006; Konno et al 1998.

O mastoparano B (MP-B), um peptídeo anfifílico em hélice- α isolado da vespa *Vespa basalis*, foi estudado em comparação ao mastoparano (MP) em relação à interação com a bicamada fosfolipídica e à atividade hemolítica e antimicrobiana.

A estrutura anfifílica do MP-B tem mais resíduos de aminoácidos hidrofílicos na superfície hidrofílica do que o MP. Embora cada peptídeo tenha um efeito consideravelmente diferente na interação com bicamadas lipídicas (sua conformação na presença de lipídeos acídicos e neutros e habilidade de liberação de corantes de lipossomos encapsulados), no modo de interação total foi similar. MP-B causou uma mudança no formato de eritrócitos de discóide normal para uma forma crenada (chamada equinócitos).

O MP revelou forte atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas mas não contra bactérias Gram-negativas. Enquanto isso, MP-B demonstrou ser fortemente ativo tanto para bactérias Gram-positivas, como para bactérias Gram-negativas. Esses peptídeos apresentaram praticamente os mesmos resíduos de aminoácidos no lado hidrofóbico, e essa diferença na atividade biológica em membranas parece estar relacionada à superfície da área hidrofílica desses peptídeos (Park et al 1995).

Nos estudos com as atividades antibacterianas e hemolíticas da Cabrolina, FLPLILRKIVTAL-NH₂, um peptídeo com 13 resíduos de aminoácidos presente no veneno do vespão *Vespa crabro* e peptídeos correlacionados, demonstrou-se que apesar da conformação helicoidal ser necessária para a atividade hemolítica, este não é um pré-

requisito para a atividade antibacteriana (Konno et al 1998).

Dos Santos Cabrera e colaboradores (2004) descreveram o EMP-AF como sendo capaz de penetrar através de lipossomos aniônicos, e em uma extensão menor nos lipossomos neutros. Demonstrou-se que a habilidade de permeação é bem correlacionada à quantidade de conformações de alfa-hélices assumidas pelos peptídeos nesses ambientes. Estes peptídeos também apresentaram um amplo espectro de atividades inibitórias contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A permeabilidade de lipossomos e o efeito antibiótico apresentaram significativa redução quando o C-terminal foi desaminado (tornando-se ácido). A remoção dos três primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal fez com que o peptídeo se tornasse inativo, tanto em lipossomos como em bactérias. O peptídeo Mastoparano induz hipotermia em camundongos Swiss após 15 minutos de injeção intraperitoneal. Este efeito também é induzido por outros mastoparanos isolados dos venenos de outras espécies de vespas (Dudevani et al 1991).

2.1.6 Outras Atividades Encontradas

Já está bem documentado que diversas toxinas presentes nos venenos de aranhas, escorpiões, serpentes e moluscos marinhos correspondem a peptídeos biologicamente ativos, dos quais, uma porcentagem significativa, é rica em pontes dissulfeto que estabilizam suas estruturas tri-dimensionais (Ueberheide et al 2009). A possível função biológica dessas moléculas está na capacidade de interagirem especificamente com canais iônicos, sendo importantes ferramentas para se estudar esses canais (Ueberheide et al 2009).

Atualmente, uma nova classe de peptídeos isolados dos venenos de vespas sociais que apresentam características estruturais semelhantes, tem recebido atenção. Trata-se dos peptídeos que apresentam dois resíduos de cisteína em sua estrutura.

Dohtsu et al (1993) isolaram do veneno da vespa *Protonectarina sylveirae*, o peptídeo Silverina, que não apresentou homologia de sua sequência primária com nenhuma classe de peptídeo anteriormente caracterizada. Até o presente momento, é o único peptídeo no veneno de vespas sociais publicado, que apresenta ponte dissulfeto. O fato mais interessante deste peptídeo é que se trata de um potente indutor da liberação de histamina de mastócitos, mas que não causa hemólise e, provavelmente, o seu modo de ação difere daquele dos mastoparanos (Dohtsu et al 1993).

Nos últimos anos, o laboratório de biologia estrutural e zooquímica do centro de

estudos de insetos sociais do instituto de biociências da UNESP de Rio Claro/SP, isolou e caracterizou diversos outros peptídeos formadores de ligação dissulfeto a partir dos venenos de algumas espécies de vespas sociais como mostrado na tabela 5.

TABELA 5: Peptídeos com pontes dissulfetos isolados do veneno de vespas.

Peptídeos	Sequência Primária e N-terminal	Referências
Silverina	S K G K I C K I I G K I G K K P P F C P	OH Dohtsu et al 1993
Sedulina	S K G K I C K I I G A K I G K K P P C P	OH *
Exiguina	S I K D K I C K I L U A K I G K K P P I C	OH *
Cyanina	G L K D L C K I L E A K F G K K L P F C P	OH *
Pallipina	S I K H K I C L I E R K I G I K L P F C	OH Costa et al 1996
Polybina	S I K D K I C K I I Q A Q C G K K L P F V	NH ₂ de Souza 2002

Todos os peptídeos listados acima apresentam uma ponte dissulfeto, entre os grupos tióis dos resíduos de cisteína;
* Resultados ainda não publicados.

Ainda segundo a tabela acima, percebe-se que, comparados com os demais tipos de toxinas peptídicas isoladas de Vespidae, trata-se de poucas sequências descritas até o momento. Quando alinhados, verifica-se que essas sequências são relativamente conservadas umas em relação às outras; que os resíduos de cisteína apresentam diferentes posições de 6 ou 7 e 14, 19, 20 ou 21; e, todos possuem C-terminal ácido, exceto o peptídeo Paulistina, que possui C-terminal amidado.

Corsi (2001) em estudos relacionados com os mecanismos de secreção de insulina por células β pancreáticas, determinou que a Silverina, provoca significativa redução da secreção de insulina dessas células, sugerindo que a ação é independente do metabolismo celular. Provavelmente este peptídeo é capaz de modular a captação de íons cálcio, interagindo com o movimento desse íon para o interior das células beta, interferindo, dessa forma, na extrusão dos grânulos de insulina (Corsi 2001).

Sabe-se que o peptídeo AvTx7, isolado do veneno da vespa *Agelaia vicina*, estimula a liberação do glutamato na presença de bloqueadores de canais de cálcio e sódio, sugerindo que esta ação não é mediada através desses canais. No entanto, esse peptídeo potencializa a liberação de glutamato na presença de bloqueadores de canais de potássio, indicando que essa toxina possa agir através desse tipo de canal sensível a drogas. Esses resultados sugerem que o AvTx7 poderia ser utilizado para o melhor entendimento do envolvimento dos canais de potássio na liberação de glutamato (Pizzo et al 2004).

No entanto, ainda não se determinou nenhuma atividade biológica e/ou farmacológica relacionada a essas moléculas, proporcionando uma nova linha de pesquisa

dentro dos estudos dos venenos produzidos pelas vespas sociais.

3 OBJETIVOS

O objetivo maior deste trabalho é realizar bioprospecção dos diferentes componentes peptídicos, presentes nos venenos das vespas sociais ***Agelaia pallipes pallipes*** e ***Agelaia vicina*** através de estudos estruturais e funcionais de cada composto peptídico isolado:

- Fracionar e purificar os peptídeos mais abundantes dos venenos das vespas supracitadas, identificando o maior número possível de novos peptídeos presentes nesses venenos;
- Determinar as características estruturais de sequências primárias destas moléculas através de estratégias analíticas, como espectrometria de massas *in tandem*;
- Modelagem molecular dos peptídeos (Agelaia MP-I, Agelaia MP-II e Pallipina-I)
- Sintetizar manualmente os peptídeos identificados por estratégia Fmoc;
- Determinar as atividades biológicas de cada um deles, através de ensaios:

In vitro: hemólise, desgranulação de mastócitos provenientes do lavado peritoneal de ratos e quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares

In vivo: dor e inflamação, capacidade modulatória da secreção de insulina de células beta pancreáticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Os ninhos das vespas sociais *Agelaia pallipes pallipes* e *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) utilizadas neste estudo foram coletados na região de Rio Claro/SP. Todas as coletas foram geo-referenciadas: S22°23'49.7"; W047°32'54" para *Agelaia pallipes pallipes* e S22°25'25.4"; W047°34'48.2" para *Agelaia vicina*.

4.2 Metodologias

4.2.1 Extração e Liofilização do veneno

Cerca de 2500 reservatórios de veneno de cada uma das espécies estudadas foram extraídos com auxílio de pinças. Estes reservatórios foram comprimidos com auxílio de um bastão de ponta arredondada na presença de solução de Acetonitrila (MeCN) (grau HPLC – adquirida da Mallinkrodt) 50% (v/v) em água ultrapura, a fim de extrair preferencialmente os componentes peptídicos, eliminando restos celulares e outros detritos que poderiam agir como contaminantes.

Em seguida, o material solubilizado foi centrifugado à 8000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente, em micro centrífuga (Centrífuga Eppendorf - Centrifuge 5415D) de alta rotação. O sobrenadante foi coletado, congelado em freezer à -80°C e liofilizado (Liofilizador a vácuo da marca HETO - Drywinner 3) (Liofilizador à vácuo da marca HETO - Drywinner 3), até posterior análise.

4.2.2 Espectrometria de Massas ESI-MS

As análises de ESI-MS e MSⁿ dos peptídeos foram realizadas em um equipamento LC-MS-IT-TOF (SHIMADZU, Kyoto). O equipamento operou com voltagem de probe em 4.50 kV, temperatura de CDL de 200°C, temperature do bloco de aquecimento 200°C, fluxo de gás nebulizante de 1.5 L min⁻¹, tempo de acumulação de íons no Ion Trap de 50 msec, faixa de massas do MS de m/z entre 100 a 3000, e do MSⁿ de m/z entre 50 a 3000, parâmetros de CID: energia, 35%; gás de colisão, 20%. O equipamento foi ajustado por auto-tuning utilizando uma solução de Na-TFA, e apresentou os seguintes parâmetros:

Para o modo positivo (+), erro de 3,08 ppm e, resolução de 10,414; Para o modo negativo (-), erro de 2,69 ppm, e resolução de 13,212 .

4.2.3 Síntese Manual de Peptídeos em Fase Sólida

A síntese dos peptídeos lineares foi realizada através do método manual em fase sólida (Merrifield 1986, Chan e Withe 2004), utilizando-se N-9-fluorenilmetoxicarbonil, também conhecida como estratégia Fmoc (Tabela 6), peptídeos esses que foram utilizados para a realização dos ensaios biológicos.

TABELA 6: Sequencias dos peptídeos isolados e identificados para a síntese.

Espécie	Peptídeos	C-Terminal
<i>A. vicina</i>	G L L	OH
<i>A. p. pallipes</i>	I L G T	OH
<i>A. p. pallipes</i>	I L G T I	OH
<i>A. p. pallipes</i>	I L G T I L	OH
<i>A. p. pallipes</i>	I L G T I L	NH ₂
<i>A. p. pallipes e A. vicina</i>	G L L K G L	NH ₂
<i>A. p. pallipes e A. vicina</i>	I L G T I L G L L K G L	NH ₂
<i>A. p. pallipes e A. vicina</i>	I N W K A I L Q R I K K M L	NH ₂
<i>A. p. pallipes</i>	I N W L K L G K A I I D A L	NH ₂
<i>A. p. pallipes</i>	G I I D D Q Q C K K K P G Q S S P V C S	OH
<i>A. p. pallipes</i>	S I K H K I C K L L E R T L K L T T P F C	NH ₂
<i>A. p. pallipes</i>	S I K K H K C I A L L E R R G G S K L P F C	NH ₂

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se 100 mg de resina NovaSyn TGR, com grau de substituição de 0,2 mmol e/g (sendo que o rendimento gira em torno de 30%, podendo diminuir a medida que aumenta o número de resíduos de aminoácidos na sequencia peptídica).

Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo N-Hidroxibenzotriazol (HOBt.H₂O, NOVABIOCHEM) e N-Metilmorfolina (NNM, ALDRICH) como agentes ativadores dos aminoácidos e Hexafluorofosfato Benzoitriazol-1-*i*1-oxi-tris-pirrolidino-fosfinio (PyBOP, NOVABIOCHEM) como agente acoplante, por um período de 30 minutos. Após cada ciclo de acoplamento foram realizadas cinco lavagens da resina com N-N-Dimetilformamida (DMF, SYNTH) e em seguida foi feita a desproteção utilizando Piperidina (FLUKA) 30% em DMF (Tabela 7).

TABELA 7: Etapas de cada ciclo da síntese de peptídeos.

Etapas	Reagentes	No de Repetições	Tempo
Desproteção	Piperidina/DMF (30:70)	duas	4 minutos
Lavagem da resina	DMF	cinco	45 segundos
Ativação do aminoácido	HOBt.H ₂ O [0,5 mmol/DMF]	uma	3 minutos
Acoplamento	105 mg PyBOP/NMM 1mmol/DMF	uma	30 minutos
Lavagem da resina	DMF	cinco	45 segundos

Todas as reações foram realizadas sob agitação mecânica em capela de segurança. Após a acoplagem do último resíduo de aminoácido, a resina foi lavada com metanol (MALLINCKRODT) e seca em liofilizador (HETO, modelo MLW – LGA 05). Após a secagem, foi feita a clivagem entre peptídeo/resina utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 82,5% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA), Etanoditiol 2,5% (v/v) (ALDRICH), Fenol 5% (m/v) e água ultrapurificada 5% (v/v), durante 2 horas sob agitação mecânica.

Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-Peptídeo foi filtrada para a retirada da resina e centrifugada em uma centrífuga refrigerada (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH) para promover a precipitação do peptídeo e uma primeira etapa de retirada dos solventes e subprodutos da síntese.

O material sedimentado foi então re-suspenso em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada (purificador NANOpure BARNSTEAD, modelo D4754) para então ser purificado através de cromatografia líquida. O controle de qualidade foi feito em espectrômetro de massas ESI-MS e sequenciamento por Química Degradativa de Edman em um seqüenciador automático (SHIMADZU, modelo PPSQ-21A). O rendimento da síntese de cada peptídeo foi de aproximadamente 30 %.

4.2.4 Sequenciamento dos Peptídeos Sintéticos por Química Degradativa de Edman

Os peptídeos sintetizados e purificados que apresentaram um único pico de massa molecular (m/z), em análises de espectrometria de massas, foram submetidos ao sequenciamento primário através da técnica de Química Degradativa de Edman para a confirmação das sequências primárias dos peptídeos. Foram colocadas amostras contendo 50-100 ug de peptídeo no seqüenciador. Estas análises foram realizados em um seqüenciador automático de fase gasosa PPSQ-21A (SHIMADZU), onde os resíduos de

aminoácidos ácidos foram identificados na forma de PTH-aminoácidos ácidos formados a partir de uma sequência de reações químicas.

A reação de degradação de Edman ocorre no lado N-terminal da cadeia peptídica liberando um resíduo por ciclo reativo. Os resíduos (PTH-aminoácidos) foram identificados através de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) calibrado com padrões de PTH-aminoácidos (WAKO CHEM.), equipado com uma bomba modelo LC-10AS (SHIMADZU) e um detector de luz ultravioleta modelo SPD-10A, acoplados ao próprio seqüenciador. O controle do sistema e aquisição dos dados foi realizado através do software PPSQ-20 Data Processing e CLASS LC-10A (SHIMADZU).

4.2.5 Redução e Carbamidometilação dos Resíduos de Cisteína

A reação de redução consiste na diminuição do número de oxidação (NOX) de uma espécie química, ou seja, significa ganho de elétrons; enquanto que a de alquilação é a transferência de um grupo alquila de uma molécula para outra. Os resíduos de cisteína são muito reativos através de seus grupos tióis e rapidamente formam pontes dissulfeto. As reações de redução e carboximetilação ou carbamidometilação (RCM) são utilizadas para bloquear os resíduos de cisteína e prevenir que as pontes dissulfeto voltem a se formar. A reação é normalmente utilizada após as análises de sequenciamento de proteínas e peptídeos, suspeitos de apresentarem resíduos de cisteína em sua composição, tornando o seqüenciamento mais compreensível (Stark 1965; Lippincott e Apostol 1999).

Proteínas e peptídeos naturais podem apresentar em suas sequencias resíduos de cisteína livres ou formando pontes dissulfeto. Nestes casos a redução e a RCM são indicadas para o sequenciamento e determinação da existência ou não, de pontes dissulfeto, que asseguram a estabilidade das estruturas secundária e/ou terciária, como mostra o esquema mostrado na figura 1 (Stark 1965, Lippincott e Apostol 1999).

Para se realizar a reação de carboamidometilação, os peptídeos cíclicos foram fracionados e coletados como descrito anteriormente. Os peptídeos foram ressuspensos em 100 µL de tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,5 em uma concentração de 1 µg/µL. Uma solução de 50 mM de Ditioneitol (DTT) (AMERSHAM BIOSCIENCE) foi preparada utilizando-se o mesmo tampão em que os peptídeos foram solubilizados. Uma alíquota de 25µL dessa solução de DTT foi adicionada à amostra. A solução resultante foi homogeneizada e mantida a 40°C por 30 minutos, e em seguida resfriada à temperatura ambiente. Após esse procedimento, 25 µL de Iodoacetamida (IAA) 100 mM (AMERSHAM

BIOSCIENCE), também preparada em tampão bicarbonato de amônio, foi adicionada à mistura. A solução resultante foi deixada por uma hora em ambiente escuro à temperatura ambiente para que a reação de carbamidometilação pudesse ocorrer.

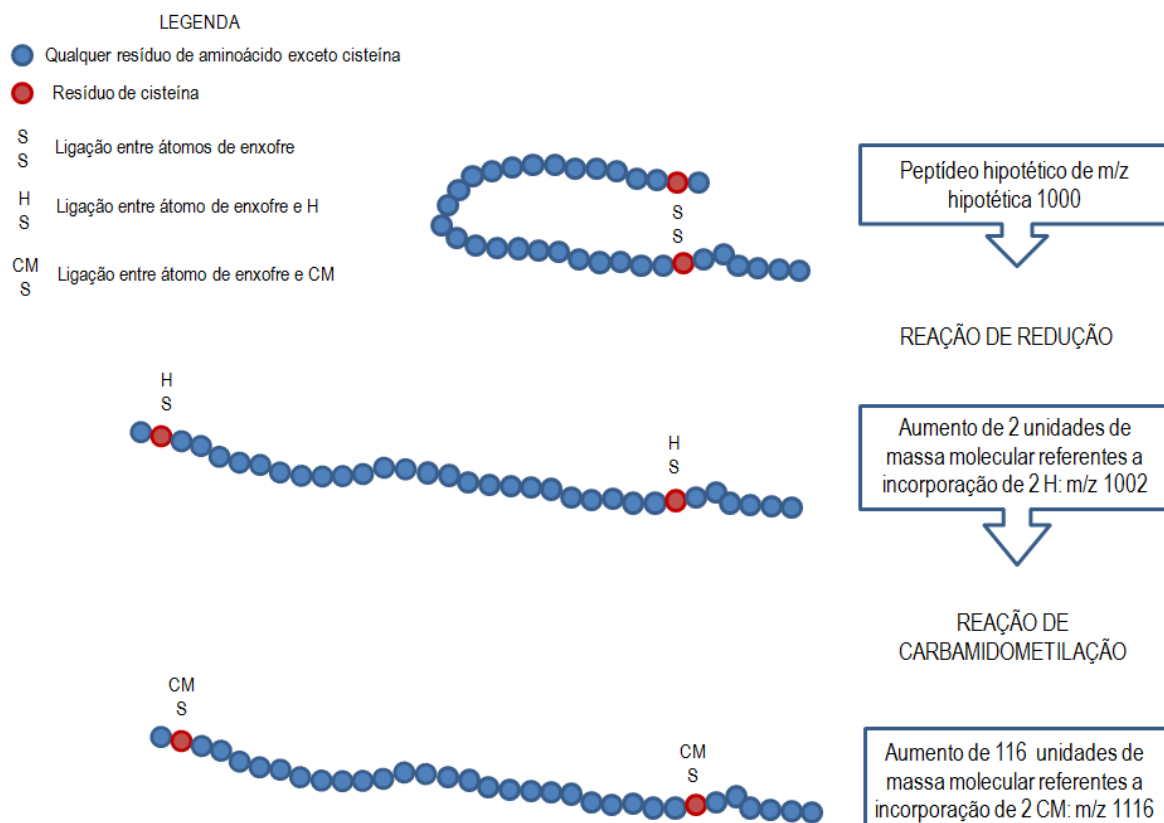
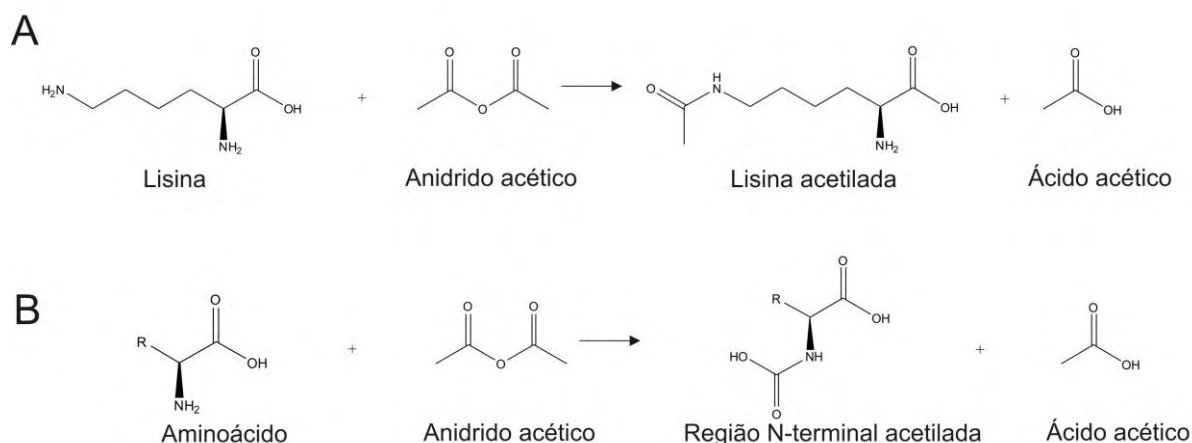


FIGURA 1: Esquema mostrando o aumento de massa após cada evento de reação de redução e alquilação de uma molécula peptídica hipotética.

4.2.6 Acetilação dos Resíduos de Lisina

Esta reação tem como função distinguir os resíduos isóbaros de Lys e Gln, sendo que o resíduo C-terminal com amina livre também sofre acetilação, reação esta, mostrada no esquema 1. Nesta reação, ocorre a introdução de um grupamento acetil em um composto orgânico, no lugar do hidrogênio.

Para tanto, a amostra (1 µg/µL) foi solubilizada em 5 mL Anidrido Acético (Merck Química Brasil, 98%), homogeneizada em vórtex e incubada por 45 minutos a 37° C sob leve agitação. Em seguida, analisou-se por ESI-MSⁿ e MS². O resultado da reação é o acréscimo de 42 unidades de massa a massa molecular do resíduo de Lys e/ou grupamento -NH₂.



ESQUEMA 1: Esquema exemplificando as reações de acetilação da (A) lisina e (B) posição N-terminal de um aminoácido hipotético.

4.2.7 Modelagem Molecular por Homologia e Métodos de avaliação dos modelos estruturais

Para a construção do modelo estrutural de cada um dos peptídeos identificados, utilizou-se a modelagem molecular por homologia, o qual é o principal método computacional utilizado para prever estruturas terciárias de proteínas. Esta é uma técnica de desenvolvimento de modelos tridimensionais que parte de uma sequência primária conhecida de uma proteína cuja estrutura tridimensional ainda não foi determinada e, utiliza como molde uma ou mais sequências de proteínas cujas estruturas tridimensionais já foram resolvidas por técnicas experimentais e, que possuem alta similaridade com a proteína de interesse (Gibas et al., 2001). Consiste de quatro etapas principais (Sanchez et al 1997):

1) Busca e seleção do molde: consiste recebeu uma busca por proteínas que possuem suas estruturas tridimensionais resolvidas. Esta busca é realizada em bancos de dados de estruturas terciárias de proteínas, sendo que o principal deles é o *Protein Data Bank* (PDB - Berman, et al., 2000).

2) Alinhamento: depois de escolhido o molde é necessário realizar o alinhamento da sequência do molde com a sequência da proteína a ser modelada, de forma que se possa aproveitar melhor a porcentagem de identidade entre eles.

3) Modelagem: nesta etapa, o software escolhido irá receber como entrada o arquivo contendo as sequências alinhadas e o arquivo contendo as coordenadas tridimensionais do molde. Dessa forma, o programa contrui a estrutura tridimensional da proteína alvo baseado nas coordenadas tridimensionais do molde;

4) Análise: na última etapa analisou-se da estrutura gerada. Esta análise consiste em estudar as posições atômicas dos modelos de modo que possa determinar a qualidade estereoquímica do modelo da proteína em questão.

Caso o modelo apresente uma boa qualidade estereoquímica, ele poderá ser aceito como um modelo confiável para auxiliar no estudo estrutural e funcional desta proteína, além de poder contribuir para o desenvolvimento de drogas baseado em estrutura. Com exceção da etapa de análise, todas as outras etapas acima descritas foram realizadas pelo programa MODELLER versão 9v6 (Sanchez et al 1997), que realiza a modelagem por homologia de estruturas de proteínas por satisfação de restrições espaciais.

Métodos de análise do modelo molecular

O modelo pode ser avaliado como um todo, bem como em regiões individuais. Como a qualidade do modelo depende em grande parte do molde utilizado, é preciso que este tenha sido obtido em alta resolução ($\leq 2\text{Å}$) e com um fator-R satisfatório ($\leq 20\%$). A qualidade do modelo construído será proporcional à qualidade da estrutura tridimensional utilizada como "template" (Sanchez et al 1998).

Procheck

O programa Procheck (Laskowski et al 1994) analisa a geometria global da estrutura ou cada resíduo individualmente, utilizando parâmetros estereoquímicos derivados de estruturas de alta resolução ou bem refinados (Morris et al 1992), que constituem sua base de dados. Trata-se de um programa pertencente ao pacote CCP4 (*Collaborative Computational Project No 4*) utilizado para verificar a qualidade estereoquímica de proteínas.

Os parâmetros estereoquímicos utilizados são aqueles descritos por Morris et al. (1992). Os parâmetros utilizados como informações estereoquímicas checadas pelo programa são: ligações covalentes, planaridade de grupos planares (aromáticos, ligações peptídicas, etc.) ângulos diédricos, quiralidade, interações não covalentes, ligações de hidrogênio da cadeia principal e pontes de dissulfeto. Os resultados são apresentados em vários arquivos diferentes, entre os quais escolheu-se o Diagrama de *Ramachandran* e o G-factor.

O Diagrama de *Ramachandran* analisa a qualidade estereoquímica dos modelos construídos, pois representa através de um plano, a posição dos aminoácidos de acordo com os ângulos de torção ϕ e ψ formados entre o carbono- α e o nitrogênio (C α -N) e os ângulos formados entre o carbono e o carbono- α (C-C α) respectivamente. Em princípio, ϕ e ψ podem ter qualquer valores entre -180° e $+180^\circ$, porém, muitos valores dos ângulos ϕ e ψ são proibidos pelas interferências estéricas entre átomos pertencentes ao mesmo esqueleto polipeptídico e pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (Gibas et al 2001).

O G-factor verifica os comprimentos de ligação de cadeia principal, ângulos da cadeia principal, distribuição dos ângulos Φ/ψ , distribuição dos ângulos χ_1/χ_2 e ω . Fornece uma medida do desvio de uma dada propriedade estereoquímica (ângulos de torção e geometria covalente), baseado nas distribuições observadas nos parâmetros estereoquímicos em sua base de dados e uma medida da normalidade da estrutura como um todo. O cálculo do G-factor global envolve os diversos G-factors para toda a estrutura, num único número. O G-factor global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula. Por exemplo, os resíduos que caem nas regiões não permitidas do diagrama de Ramachandran terão um G-factor baixo (ou muito negativo). Se uma proteína tiver muitos resíduos com G-factor baixo sugere que algo pode estar errado com a geometria total da proteína avaliada.

4.2.8 ATIVIDADES FUNCIONAIS

4.2.8.1 Animais

Para os ensaios de determinação das possíveis atividades biológicas dos peptídeos identificados neste trabalho, utilizou-se dois modelos animais: ratos Wistar machos com cerca de 200 gramas e camundongos Swiss machos com cerca de 90 dias.

Tanto os ratos (cujas secreções foram utilizadas para os ensaios de hemólise, desgranulação de mastócitos e quimiotaxia) quanto os camundongos (utilizados nos ensaios de hiperalgesia e edema), foram anestesiados com quetamina e xilazina na proporção de 1:1 (v/v). Os camundongos, utilizados nos ensaios de secreção de insulina, foram anestesiados com CO₂.

Exceto para os ensaios de hemólise, depois de anestesiados, os animais foram imediatamente eutanasiados por decaptação.

4.2.8.2 Atividade Hemolítica

Os experimentos de atividade hemolítica foram realizados a partir de modificações da metodologia descrita por Baptista-Saidemberg (2007). As concentrações testadas para os peptídeos variaram de 10^{-7} M a 10^{-3} M (concentrações estas, já bem estabelecidas na literatura).

Foram adicionados cerca de 500 μ L de sangue extraído da cauda de ratos Wistars machos em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85 %, CaCl_2 10 mM) sob leve agitação por 15 minutos, em agitador magnético (MA-089 MARCONI). A suspensão de eritrócitos foi centrifugada em presença de solução salina, em uma centrífuga clínica (Z-200A HERMLE) a 3000 rpm durante 15 minutos para lavagem das células, também em solução salina. Esta operação foi repetida por mais duas vezes. O sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o concentrado de hemácias obtido ao final das centrifugações foi considerado como sendo 100 % de células (~ 280 μ L). Em seguida, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 1 % diluindo se a suspensão concentrada descrita acima, com solução salina isotônica.

Essa suspensão de células a 0,5 % foi utilizada nos testes de atividade hemolítica. Foram montadas baterias de ensaios em microplacas (COSTAR), onde cada orifício foi preenchido com os diferentes peptídeos, solubilizados em solução salina: no primeiro pocinho de cada linha correspondentes à toxina/mistura das toxinas foi colocado 90 μ L de solução salina. Nos demais pocinhos, colocou-se apenas 50 μ L de solução salina. Em seguida, acrescentou-se 10 μ L da solução de peptídeo(s) (solubilizado em água ultrapura) nas diferentes concentrações e proporções em cada primeiro pocinho e promoveu-se diluições nos demais pocinhos referentes a cada linha. Após esse procedimento, acrescentou-se 50 μ L de suspensão de eritrócitos em cada pocinho, perfazendo um volume final de 100 μ L. Para o controle de 0% de hemólise, misturou-se 50 μ L de solução salina e 50 μ L de suspensão de eritrócitos. Para o controle de 100 % de hemólise, misturou-se 40 μ L de solução salina, 10 μ L de 1 % (v/v) de Triton X-100 (SIGMA) e 50 μ L de suspensão de eritrócitos.

A microplaca foi incubada à temperatura ambiente (~ 26 °C) por 2 horas sob agitação. Após o período de incubação, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga Compacta Avanti 30 (BECKMAN). O sobrenadante de cada preparação foi utilizado para a montagem de uma nova placa, para realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (AMERSHAM BIOSCIENCE,

modelo Biotrak II), com filtro de 540 nm.

4.2.8.3 Atividade Desgranuladora de mastócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de Ratos Wistar Machos

A desgranulação de mastócitos foi determinada através de medidas da liberação de β -D-glucosaminidase (que se co-localiza com a histamina) a partir dos grânulos, segundo metodologia descrita por Hide et al (1993), com algumas modificações.

As concentrações testadas para os peptídeos de interesse são as mesmas realizadas nos ensaios de atividade hemolítica (10^{-7} M a 10^{-3} M, concentrações estas, já bem estabelecidas na literatura). Para a realização dos ensaios de Desgranulação de mastócitos, foi necessária a preparação das soluções:

- Solução MCM-1 (Mast Cell Medium): 150 mM NaCl (MERCK), 4 mM KCl (MERCK), 4 mM NaH_2PO_4 (SYNTH), 3 mM KH_2PO_4 (SYNTH), 5 mM glucose (SYNTH), 15 M BSA (SIGMA) e 1 mM CaCl_2 (VETEC).
- Solução MCM-2: 100 mL de solução MCM-1 e 50 L de Liquemine (heparina sódica 5000 UI/0,25 mL ROCHE).
- Solução SH: 0,2 M de citrato de sódio (MERCK), com pH 4.5 e 0,0034 g de p-nitrofenil-B-D-glicosamina (SIGMA).

A cavidade peritoneal foi exposta por meio de um corte longitudinal que permitiu o afastamento dos órgãos para a lavagem da cavidade com 20 mL de solução MCM-2, para a extração do fluido contendo os mastócitos em suspensão. O líquido peritoneal foi coletado com auxílio de uma seringa e, armazenado em banho de gelo. Repetiu-se esse procedimento três vezes. O líquido peritoneal foi centrifugado a velocidade de 1000 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Um volume de 2 mL da solução MCM-1 foi utilizado na ressuspensão do sedimento de células, seguida por centrifugação respeitando as mesmas condições anteriores. Descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se em 2 mL de MCM-1.

Essa suspensão de células foi utilizada nos experimentos de desgranulação de mastócitos. Realizou-se a contagem de células em Câmara de Neübauer com auxílio de uma solução corante 0,05 % (v/v) de cristal violeta em HCl (3,6 M). Ajustou-se a concentração para $7,8 \times 10^5$ células/mL. A microplaca (COSTAR) foi preparada de maneira

semelhante à do ensaio anterior. No primeiro pocinho de cada linha correspondentes à toxina/mistura das toxinas foi colocado 90 μL de MCM-1. Nos demais pocinhos, colocou-se apenas 50 μL de MCM-1. Em seguida, acrescentou-se 10 μL da toxina (solubilizado em água ultrapura) nas diferentes proporções em cada primeiro pocinho e promoveu-se diluições nos demais pocinhos referentes a cada linha. Após esse procedimento, acrescentou-se 50 μL de suspensão de mastócitos em cada pocinho, perfazendo um volume final de 100 μL . Para o controle de 0% de Desgranulação, misturou-se 50 μL de MCM-1 e 50 μL de suspensão de mastócitos. Para o controle de 100% de Desgranulação, misturou-se 50 μL de MCM-1 e 50 μL de suspensão de mastócitos que foi sonificado por 15 minutos em sonificador (BRANSON 1210).

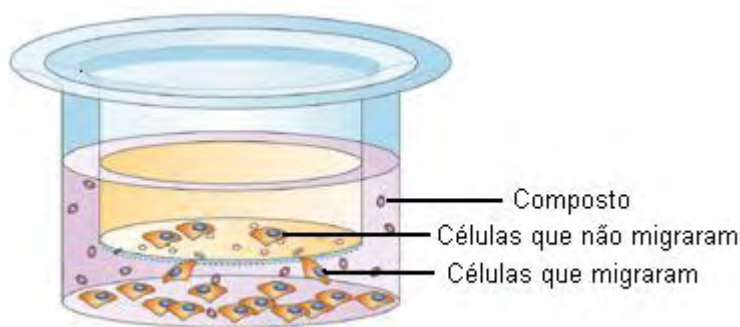
Incubou-se a microplaca por 15 minutos em banho Maria a 37 °C para o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Em seguida, centrifugou-se o conteúdo de cada orifício a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado na sequência das análises. Os sobrenadantes resultantes desta última centrifugação foram utilizados para a montagem de uma nova placa, na qual cada orifício continha 50 μL deste sobrenadante e 50 μL de Solução SH. Esta nova placa foi incubada por 6 horas a 37 °C. Passado esse período, descartou-se 50 μL de cada orifício e acrescentou-se 150 μL de solução Tris 0,2 M (SIGMA) a cada um deles. A Desgranulação foi medida através da leitura de absorbância a 405 nm em uma leitora de placas (AMERSHAM BIOSCIENCE, modelo Biotrak II). Os resultados foram expressos em função da relação entre as proporções das concentrações molares de cada peptídeo e a porcentagem de Desgranulação.

4.2.8.4 Atividade Quimiotática para Leucócitos Polimorfonucleares (PMNL's)

O ensaio de quimiotaxia consiste em determinar a capacidade ou não de um determinado composto, no caso, cada um dos peptídeos isolados neste trabalho, em atrair leucócitos para o local da inflamação. Separando a parte superior e inferior da câmara, é colocada uma fina membrana com poros com 10 μm , suficientes para que os leucócitos consigam atravessar. O esquema 2 ilustra esse experimento.

Os leucócitos foram isolados a partir da indução de inflamação subcutânea em machos adultos de ratos Wistar. A inflamação foi induzida através de uma micro cirurgia, introduzindo-se pedaços de esponja plástica (1 cm^3) esterilizadas, na região subcutânea do dorso dos ratos. Após quatro dias, foi realizada coleta do fluido rico em leucócitos

contido nas esponjas, com o auxílio de seringas de 20 mL. O fluido foi coletado em tubos Falcon para a realização da lavagem das células. Foram realizadas três centrifugações em presença de solução salina [NaCl 0,9 % (m/v)], por 3 minutos a 1000 rpm, para a retirada de hemácias, que sedimentam após a centrifugação.



Esquema 2: Esquema ilustrativo de como ocorre a quimiotaxia de células em uma câmara de quimiotaxia. Modificado de AKASHI et al, 2005.

A contagem dos leucócitos foi feita em câmara de Neübauer em concentração ajustada para $\sim 2,1 \times 10^5$ células/ensaio, para determinação da relação dose/efeito para quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares. Os resultados foram expressos em número de células/mL, que migraram da parte inferior da câmara dos ensaios, nas diferentes concentrações de cada peptídeo (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M).

Para o ensaio de quimiotaxia foi utilizado uma câmara de quimiotaxia (Figura 2) (Neuro Probe, USA) (FALK et al 1980), onde cada um dos orifícios da parte inferior da câmara foi preenchido com as amostras diluídas em 400 μ L de solução salina fisiológica, contendo quatro concentrações diferentes (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) em triplicata.

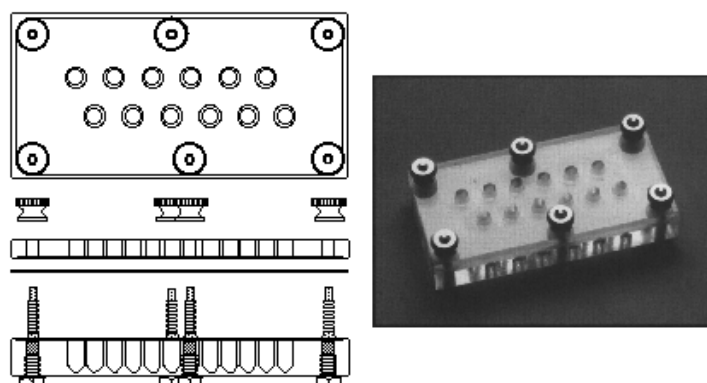


FIGURA 2: Ilustração e imagem de uma câmara de quimiotaxia.

Colocou-se uma membrana de policarbonato contendo poros de 10 μ m de diâmetro

(Neuro Probe, USA), entre a parte inferior e a parte superior da câmara. Cada orifício da parte superior foi preenchido com 200 μ L da suspensão de leucócitos preparada anteriormente. A câmara foi incubada por 1 hora a 37 °C.

Realizou-se a contagem das células utilizando-se a câmara de Neübauer, sendo que as células foram coradas com solução 0,05 % (m/v) de cristal violeta em HCl (3,6 N) para facilitar a contagem. Os resultados foram expressos na forma do número de células que migraram de um compartimento para outro da câmara de neuroprovas, em função da concentração molar de cada peptídeo e das proporções entre as mesmas.

4.2.8.5 Atividades de Dor e Inflamação

4.2.8.5.1 Von Frey Eletrônico

O von Frey eletrônico é um instrumento comercialmente encontrado similar ao utilizado para avaliação da hipernocicepção inflamatória em ratos (Vivancos et al 2004). O método eletrônico possui uma série de vantagens em relação aos métodos clássicos, tais como, redução do número de medidas realizadas para aquisição do limiar nociceptivo, eliminação de problemas na padronização do teste, estimulação de áreas de tamanho igual, e as medidas são automaticamente mensuradas (Jensen et al 1986).

Os camundongos foram colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Os animais foram colocados nestas gaiolas 30 minutos antes do início do teste, para adaptação comportamental. Os testes foram realizados apenas quando os animais estavam quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e sem lambe-rem seus membros.

Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica foi mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1 g e o aparelho foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, SP, BRA).

O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno adaptada. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior dos animais, para indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de

pressão eletrônica registrou automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro for retirado.

O teste foi repetido até que se obtivessem três medidas subseqüentes, de tal forma que a variação entre as medidas não fossem maiores que 1 g. Os camundongos foram, então, foram submetidos ao von Frey em diversos tempos após a administração, por via intraplantar, dos peptídeos e carragenina (controle positivo).

4.2.8.5.2 Edema de Pata

Avaliou-se o efeito edematogênico dos peptídeos. Os camundongos receberam uma aplicação intraplantar (em uma das patas) de peptídeos, carragenina 1%, ou veículos (controles). O volume da pata foram realizadas nos tempos zero (imediatamente após as injeções dos peptídeos ou carragenina) 120, 240, 360, 480 e/ou 1440 minutos após a injeção do agente flogístico, utilizando um Paquímetro digital marca Mitutoyo^R (Código 500-196-20B) de especificação 0-150X0,01 mm paquímetro (modelo CD-6"CSX-B, Mitutoyo Sul Americana Ltda).

O aumento percentual do volume das patas foi calculado através da expressão:

$$A (\%) = (V_f - V_i) \times 100 / V_i$$

Onde: A (%) = aumento percentual do volume da pata;

V_i = volume inicial da pata;

V_f = volume da pata após a injeção dos peptídeos, carragenina ou veículo (controle).

O resultado final foi obtido subtraindo-se os valores controles (animais injetados com veículo) dos valores testes (animais injetados com os peptídeos).

4.2.8.6 Atividades de Metabolismo do Pâncreas Endócrino

4.2.8.6.1 Isolamento das Ilhotas Pancreáticas de Camundongos Swiss

Após incisão abdominal o fígado foi rebatido para expor a vesícula biliar, e a porção proximal do ducto biliar comum. Utilizando-se de um fio cirúrgico o ducto pancreático foi

obstruído a altura da ampola de *Water* para evitar a saída de solução de colagenase para o duodeno. Na porção distal do conduto biliar comum, abaixo da vesícula biliar foi realizada uma pequena incisão no ducto, com tesoura cirúrgica oftalmológica, para introduzir uma agulha de insulina, e em seguida a agulha foi fixada em sua posição por meio de um fio cirúrgico. Através dessa agulha injetou-se no pâncreas 2 a 3 ml de solução de Hanks com colagenase tipo V (0,8 mg/ml; Sigma), este procedimento facilita o acesso da colagenase para todo o pâncreas para sua conseqüente extração.

O pâncreas foi retirado da cavidade abdominal por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml, em seguida foi adicionado mais 7 ml da solução de Hanks com colagenase e o tubo foi submergido em banho termostaticado a 37°C durante 11 min. No final deste período foi realizada uma pequena agitação de 30 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de Hanks a 4 °C. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta *Pasteur*, previamente estirada e siliconizada.

4.2.8.6.2 Secreção Estática de Insulina

Grupos de 4 ilhotas foram transferidas para placas de cultura com 24 poços contendo 0,5 ml de solução de Krebs contendo 5,6 mM glicose, 0,3% de albumina. A seguir as placas foram acondicionadas em banho-maria a 37°C, e mantidas por 30 min em ambiente controlado (umidificado e gaseificado com 95 % O₂/5 % Co₂), pH 7,4.

Após este período, solução de pré-incubação foi removida e substituída por nova solução de incubação contendo diferentes concentrações de glicose na presença ou ausência dos peptídeos: Agelaia MP-I (8 uM), Pallipina-I (cadeia aberta) (1 uM), Pallipina-II (1 uM) e Pallipina-III (1 uM). Após 1h, as placas foram resfriadas em banho de gelo, o sobrenadante transferido para tubos de ensaio e armazenado a - 20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Scott et al 1981).

4.2.8.6.3 Dosagem da Secreção de Insulina

As amostras da secreção estática de insulina foram quantificadas pelo método de radioimunoensaio (Scott et al 1981), utilizando-se anticorpo específico anti-rato (doado gentilmente por Dr. Leclercq-Meyer, Free University, Brussels, BEL), insulina de rato para

traçar a curva padrão (Crystal Chem. Inc., Downers Grove, IL, USA) e insulina recombinante humana marcada com Iodo 125 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, UK). Para separação da insulina livre e da porção antígeno-anticorpo formada utilizou-se o método do carvão ativado e dextran.

4.2.9 Análises Estatísticas

Para os ensaios de hemólise, desgranulação de mastócitos e quimiotaxia utilizou-se teste paramétrico e análise de variância ANOVA (Bonferroni), BioEstat 2.0 (Ayres et al 2000).

No caso dos ensaios de hiperalgesia e edema, utilizaram-se Anova duas vias, seguida por meio de análise de variância associada ao teste de Turkey (Kleinbaum et al 1998).

Para os ensaios de secreção de insulina, utilizou-se o teste *t-Student*.

Todos os resultados foram expressos como média \pm DPM (ensaios de hemólise, desgranulação e quimiotaxia) ou \pm EPM (demais ensaios), e $p < 0,05$ foi adotado como critério de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ANÁLISE PEPTIDÔMICA

Os resultados foram divididos em duas partes:

PARTE I: Resultados das Análises Estruturais dos Peptídeos por Espécie de Vespa Social

5.1 – Refere-se aos resultados obtidos do veneno da vespa social neotropical *Agelaia pallipes pallipes*

5.2 – Refere-se aos resultados obtidos do veneno da vespa social neotropical *Agelaia vicina*

PARTE II: 5.3 Resultados das Análises Funcionais dos Peptídeos Identificados

**PARTE I: RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS
PEPTÍDEOS POR ESPÉCIE DE VESPA SOCIAL**

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO OBTIDOS NAS ANÁLISES DO VENENO DA VESPA SOCIAL NEOTROPICAL *Agelaea pallipes pallipes*

5.1.1 Separação dos Componentes Peptídicos

O produto obtido da extração do veneno da vespa social neotropical *Agelaea pallipes pallipes* em acetonitrila 50% (v/v), resultou na eluição de 12 frações ou picos (Figura 3).

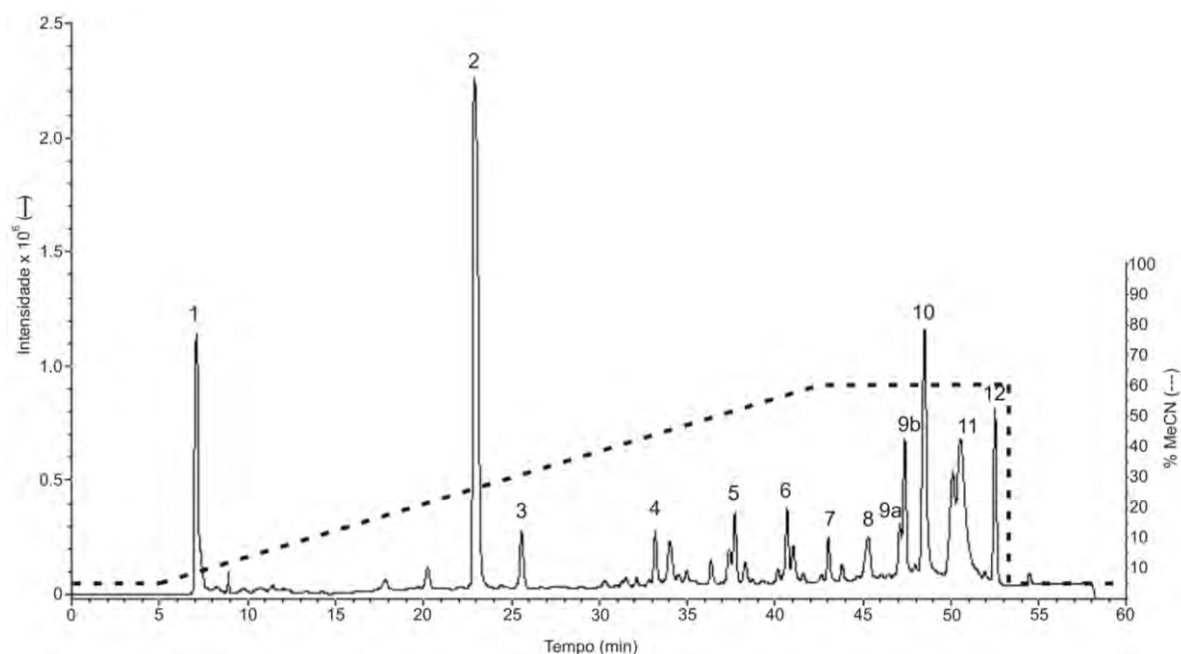


FIGURA 3: Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social *A. p. pallipes* RP-LCMS (SHIMADZU, Kyoto) utilizando-se de uma coluna WATERS Acquity UPLC® BEH130 C-18 (2,1 x 100mm, 3,5 µM), e um fluxo constante de solventes de 0,2 ml/min. A eluição foi realizada inicialmente em condições isocráticas de 0 a 5 minutos com 5% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA), seguida por um gradiente linear de 5 a 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 5,1 a 42,0 min a 28 °C.

O controle de homogeneidade foi realizado através de análises de ESI-MS, cujo resultado demonstrou que todas as frações deveriam ser purificadas (resultados não mostrados). Além disso, constatou-se que as frações de 1 a 4 apresentaram-se como sendo compostos de baixas massas moleculares já analisadas em outro trabalho (Saidemberg 2009). As demais frações correspondem aos peptídeos de interesse para

este trabalho.

5.1. 2 Fracionamento e Sequenciamento dos Peptídeos

Inicialmente, a proposta para o trabalho era a de sequenciar os peptídeos utilizando-se da química degradativa de Edman, o que não foi possível devido às baixas concentrações dos peptídeos obtidos (uma vez que se procurou minimizar o número de vespas utilizadas para a extração de veneno). No entanto, o sequenciamento dos peptídeos (Figuras 4 a 12) apresentados neste trabalho foi possível graças à utilização de técnicas modernas de espectrometria de massas (LC-IT-TOF-MS e MSⁿ).

Para isso, foram determinadas condições experimentais ideais para gerar uma fragmentação dos peptídeos em suas ligações peptídicas, seguido da identificação das diferenças de massas entre os picos consecutivos de fragmentos correspondentes às massas (–NH–CHR–CO–) dos resíduos de amino ácidos naturais. Dessa forma, foi possível o reconhecimento de uma ou mais séries de íons dos tipos b- e/ou y-, os quais por sua vez, permitem a determinação das sequências dos peptídeos com somente algumas ambiguidade em relação aos resíduos isobáros (Ile/Leu e Lys/Gln).

A distinção entre os resíduos de Leu e Ile foi realizada através da observação dos fragmentos iônicos do tipo d- e w-, através da utilização de alta energia de colisão ou dissociação por captura de elétrons, para obter espectros CID dos peptídeos. Dessa forma, torna-se possível analisar íons resultantes da fragmentação parcial das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, identificados pelos íons do tipo w- e/ou d-. Por exemplo, os íons do tipo d- correspondem à clivagem α da cadeia lateral do aminoácido C-terminal resultando na formação de íon-fragmentos. Ion-fragmentos do tipo w- também podem ser formados nesse processo, se a posição do resíduo de Ile for adjacente ao sítio de clivagem no esqueleto de carbonos α da cadeia peptídica, levando a formação de íons do tipo w- e/ou d-. Neste caso, a massa molecular desses íons será 14 Da maior em relação à fragmentação da cadeia lateral do resíduo de Leu (Mendes et al 2004a, c).

Apesar das condições experimentais do protocolo utilizado não envolver elevada energia de colisão, foi possível observar a presença de fragmentos iônicos do tipo d- e w-. Espectros simulados também foram criados a partir da utilização do *software* Protein/Peptide Editor no BioLynx/Mass Lynx (v 3.2) da Micromass, com diferentes combinações de I e/ou L em posições ambíguas. Em seguida, esses espectros simulados

foram comparados aos espectros experimentais, auxiliando na identificação de fragmentos iônicos tanto da série d- como também da série w-.

Apesar disso, dúvidas relacionadas à distinção entre Ile e Leu nas posições N- e C-terminais de cada peptídeo podem permanecer, se estes resíduos de amino ácidos estiverem nestas posições, uma vez que nessas posições não ocorrem fragmentações das cadeias laterais (Mendes et al 2004a, c). Nestes casos, os peptídeos com diferentes combinações de Ile ou Leu nas posições terminais foram sintetizados e purificados. Os tempos de retenção para cada peptídeo sintético foram obtidos, e comparados com o peptídeo natural, utilizando-se de cromatografia de fase reversa e eluição isocrática com acetonitrila como fase móvel. Além disso, a distinção entre os resíduos de Lys e Gln foi obtida através de reação de acetilação dos grupos amino α e ϵ em cada peptídeo obtido, Neste caso, somente o grupo N-terminal não bloqueado e as cadeias laterais dos resíduos de Lys são susceptíveis a esta reação.

A figura 4A mostra o espectro ESI-MS da fração 5, onde o íon de m/z 403,26 como $[M+H]^+$ apresenta-se como maior sinal. A figura 4B mostra o espectro MS^2 do íon molecular de m/z 403,26. A perda de água (18 Da) à partir do íon molecular $[M+H]^+$ também é observada, gerando o íon de m/z 385,30, a partir do qual alguns íons pertencentes à série b- foram formados com m/z 284,19 (b_3) e 227,18 (b_2).

A subtração dos valores de m/z consecutivos de íons b- permitiu a determinação da sequência do peptídeo presente na fração 4, com algumas pequenas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L: I/L-I/L-G-T. Uma observação mais cuidadosa do espectro MS^2 (Figura 4B) revela os íons de m/z 157,13 (d_2) e 231,10 (w_3), indicando a presença de Leu na segunda posição da cadeia peptídica.

Em seguida, sintetizou-se dois peptídeos com os resíduos Ile e Leu na posição 1 da cadeia peptídica e os tempos de retenção, para ambos peptídeos sintéticos e natural, foram obtidos através de RP-HPLC (C18) (250 x 4,6mm, 5 μ m) com eluição isocrática em 26 % (v/v) de acetonitrila (contendo 0,1 % de TFA) a um fluxo de 2 mL/min, durante 25 minutos a 30°C (resultados não mostrados). O tempo de retenção de 20,10 minutos do peptídeo sintético com sequência I-L-G-T correspondeu ao mesmo tempo de retenção do peptídeo natural, indicando que o resíduo presente na posição 1 corresponde a Ile.

Finalmente, a massa molecular do peptídeo natural (402,26 Da) parece ser consistente com a forma acídica do C-terminal, sendo que, a sequência final completa para o peptídeo presente na fração 5 corresponde a: I-L-G-T-OH. É importante enfatizar que os

dois primeiros resíduos da posição N-terminal aparecem como o dipeptídeo I-L (m/z 227.18), característico da instrumentação do tipo *ion-trap*.

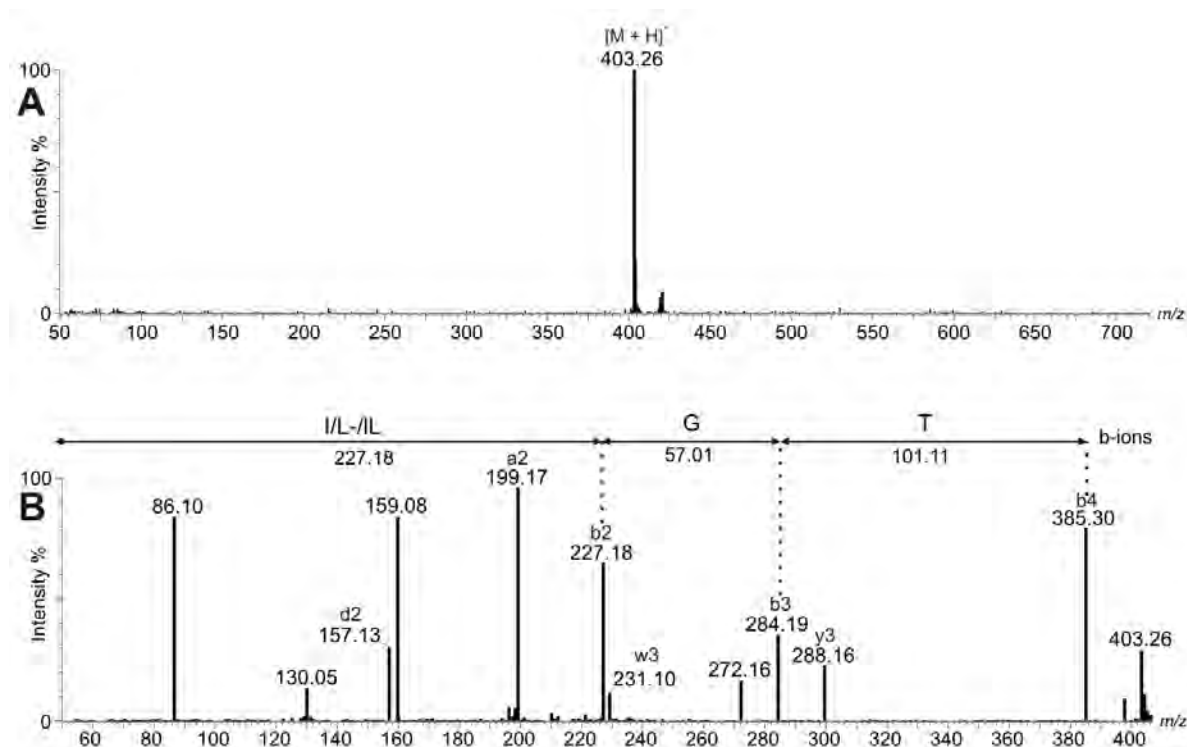


FIGURA 4: A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração App-5. B) Espectro de massas MS² da fração 5, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

A sequência acima (figura 4) é similar aos 4 primeiros resíduos do peptídeo Protonectina, previamente isolado dos venenos das vespas sociais *Protonectarina sylveirae* (Dohtsu et al 1993) e *Agelaia pallipes pallipes* (Mendes et al 2004). Por esse motivo, o peptídeo identificado na fração 5 foi denominado como Protonectina (1-4)-OH.

O espectro ESI-MS da fração 6, mostrado na figura 5A, revela picos de m/z 599,42 como $[M+H]^+$, m/z 621,41 como $[M+Na]^+$ e m/z 300,21 como $[M+2H]^{2+}$. Também se observa o pico de m/z 1197,85, correspondente ao dímero desse peptídeo como $[2M+H]^+$, e um pico de m/z 1219,85 correspondendo ao aducto de sódio do dímero como $[2M+H+Na]^+$.

A sequência do peptídeo foi determinada pela interpretação do espectro de MS² (Figura 5B) a partir do íon molecular precursor de m/z 599,42. A perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular $[M+H]^+$ também é observada, gerando o íon de m/z 582,40 (b_6). A série de íons b- também é observada nesse mesmo espectro com m/z 469,31 (b_5), 412,30 (b_4), 284,20 (b_3) e 171,11 (b_2).

A subtração dos valores de massa consecutivos dos íons da série b- permitiu o sequenciamento do peptídeo presente na fração 6, com algumas ambiguidades em relação aos resíduos isóbaros I/L e K/Q: G-I/L-I/L-K/Q-G-I/L. Quase toda a série de íons y- e a- também aparecem nesse espectro, corroborando com a sequência acima descrita.

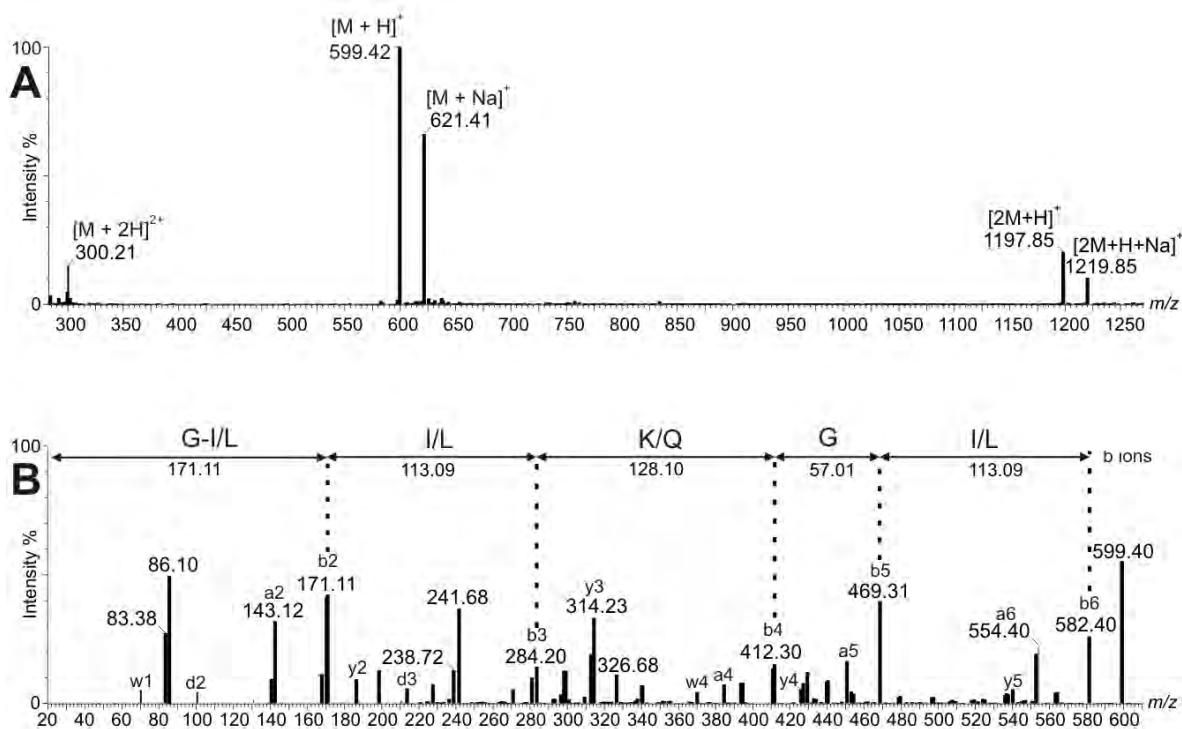


FIGURA 5: A) Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 6; B) Espectro de massas MS² da fração 6, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

A reação do peptídeo com anidrido acético resultou na modificação da massa molecular para 683,65 Da (resultado não mostrado), indicando um aumento de 84 Da na massa molecular do peptídeo (42 Da x 2), devido à ocorrência de duas reações de acetilação, i.e., no grupamento amino α do resíduo N-terminal e grupamento amino ϵ do resíduo de Lys. Esse resultado indica a presença de uma Lys ao invés de uma Gln na sequência desse peptídeo, uma vez que o Gln não sofre reação de acetilação. Portanto, a sequência do peptídeo presente na fração 6 em relação aos resíduos isóbaros K/Q é: G-I/L-I/L-K-G-I/L.

A figura 5B mostra os íon-fragmentos de m/z 101,07 (d₂), 214,16 (d₃) e 370,25 (w₄), caracterizando a presença de Leu nas posições 2 e 3 da cadeia peptídica. No entanto, ainda permaneceu a dúvida com relação à ambiguidade do resíduo I/L presente na posição 6. Por isso, os tempos de retenção para cada peptídeo sintético com os resíduos Ile ou Leu

na posição C-terminal foram obtidos e comparados ao peptídeo natural, usando RP-HPLC (C18) (250 x 4,6mm, 5 μ m) com eluição isocrática em acetonitrila 29 % (v/v) (contendo 0,1 % de TFA), a um fluxo de 2 mL/min durante 25 min a 30°C (resultados não mostrados). O tempo de retenção de 21.75 minutos do peptídeo sintético com sequência G-L-L-K-G-L correspondeu ao mesmo tempo de retenção do peptídeo natural, indicando que o resíduo de amino ácido presente na posição 1 corresponde à Leu. Por fim, a massa molecular do peptídeo natural (598,42 Da) parece ser consistente com o resíduo C-terminal da forma amidada, dessa forma, a sequência completa final do peptídeo identificado na fração 6 é G-L-L-K-G-L-NH₂.

Esse peptídeo foi denominado como Protonectina (7-12) uma vez que ele corresponde aos resíduos de aminoácidos presentes nas posições 7-12 do peptídeo Protonectina (Dothsu et al 1993, Mendes et al 2004). Além disso, essa sequência assemelha-se aos seis primeiros resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo Anopline, isolado do veneno da vespa solitária *Anoplius samarienses* (Konno et al 2000). Neste caso, a diferença está nos dois últimos resíduos que são o G-L (presentes no peptídeo Protonectina 7-12) ao invés dos resíduos de R-I (presentes no peptídeo Anopline).

A figura 6A mostra o espectro ESI-MS da fração 7, revelado dois picos, de m/z 516,34 e m/z 538,34, correspondendo aos íons moleculares na forma [M + H]⁺ e [M + Na]⁺, respectivamente. A figura 6B mostra o espectro MS² do íon molecular precursor de m/z 516,34. A perda de uma água (18 Da) do íon molecular [M + H]⁺ gerou o íon de m/z 498,33 (b₅). Uma série completa dos íons do tipo b- também foi observada com m/z 385,25 (b₄), 284,20 (b₃) e 227,18 (b₂). Somado a isso, alguns íons da série a- e y- também foram observados nesse espectro.

A subtração entre os valores consecutivos dos íons do tipo b- permitiram o sequenciamento do peptídeo presente na fração 7, com algumas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L: I/L-I/L-G-T-I/L. A figura 6B mostra, ainda, o íon fragmento de m/z 157,13 (d₂) resultante da fragmentação da cadeia lateral do resíduo Leu na posição 2 da cadeia peptídica.

A ambiguidade relacionada com os resíduos I/L presentes nas posições N- e C-terminais permaneceu. Por isso, sintetizou-se quatro peptídeos alternando-se as posições de I/L e os tempos de retenção para cada peptídeo sintético e para o natural foram obtidos utilizando-se RP-HPLC (C18) (250 x 4,6mm, 5 μ m) com eluição isocrática em acetonitrila 31 % (v/v) (contendo 0,1 % de TFA), a um fluxo de 2 mL/min durante 25 min a 30°C

(resultados não mostrados). O tempo de retenção de 22,60 minutos do peptídeo sintético com sequência I-L-G-T-I correspondeu ao mesmo tempo de retenção do peptídeo natural, indicando que o resíduo presente em ambas as posições correspondem a Ile.

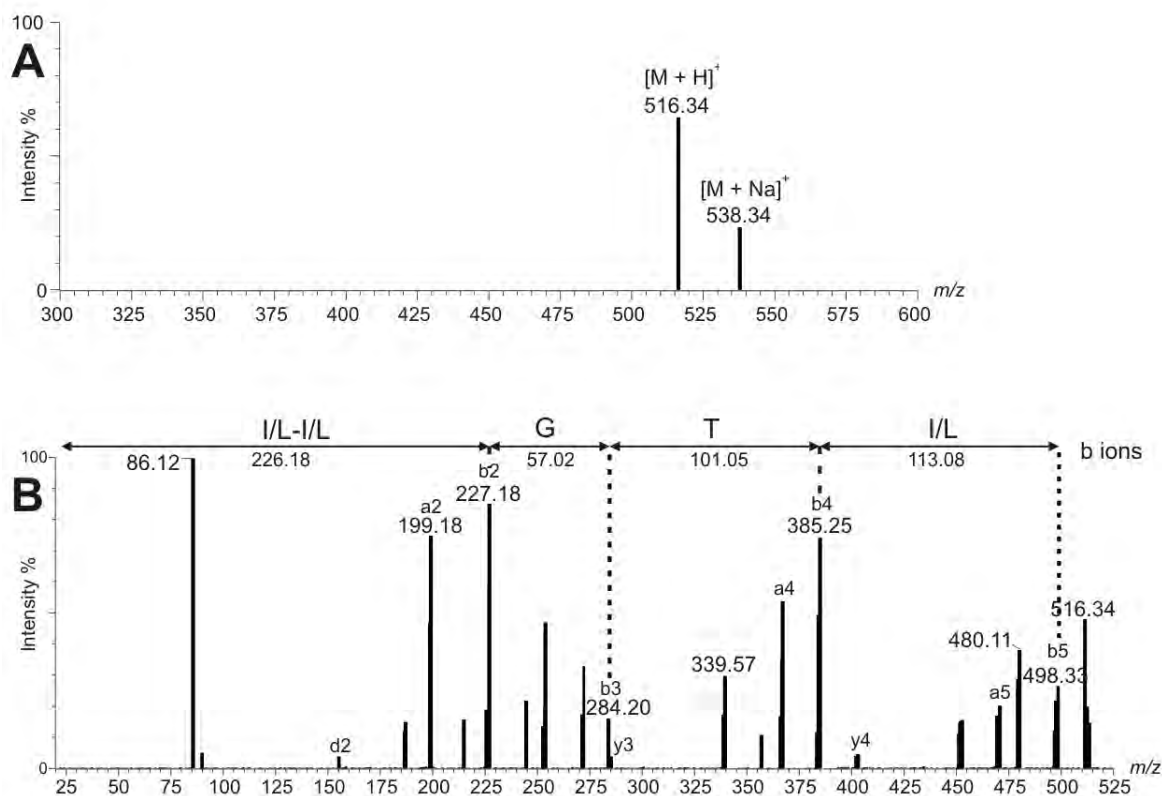


FIGURA 6: A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração 7; B) Espectro de massas MS² da fração 7, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

Por fim, a massa molecular do peptídeo natural (515,32 Da) parece ser consistente com o resíduo C-terminal da forma ácida, dessa forma, a sequência completa final do peptídeo identificado na fração 7 é I-L-G-T-I-OH. Uma vez que esse peptídeo corresponde aos cinco primeiros resíduos de aminoácidos presentes na sequência do peptídeo Protonectina (Dothsu et al 1993, Mendes et al 2004), este foi denominado de Protonectina (1-5)-OH.

A figura 7A mostra o espectro ESI-MS da fração 8, revelando 3 picos de m/z 2116,03, 1058,51 e 706,66, correspondentes aos íons moleculares $[M + H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$, respectivamente. Esse resultado indica que esse peptídeo apresenta massa molecular com 2115,02 Da.

A molécula intacta foi acetilada com a finalidade de se determinar a presença de resíduos de Lys, sendo que após essa reação, a massa molecular desse peptídeo

modificou-se para 2283.10 Da (resultados não mostrados), indicando o aumento de 168 Da (correspondentes a 42 Da x 4). Considerando-se que o grupamento amino α do resíduo N-terminal resíduo está aparentemente livre, existem no peptídeo da fração 8, três resíduos de Lys.

Além disso, a massa molecular apresentada anteriormente pode ter contribuição da presença de resíduos de Cys formadores de ligações dissulfeto. Para verificar tal possibilidade, promoveu-se a reação dessa molécula com DTT (ditiotreitól) e, em seguida, promoveu-se a reação de carbamidometilação com IAA (iodoacetoamida), como mostrado no espectro MS¹ (Figura 7B). Nesta figura, é possível visualizar três picos com valores de m/z 1116,51 [M + 2H]²⁺, 1058,51 [M + 2H]²⁺, 744,67 [M + 3H]⁺³ e 558,56 [M + 4H]⁺⁴. Esses resultados indicam que o peptídeo modificado quimicamente apresenta massa molecular de 2231,01 Da, indicando que houve aumento de 116 unidades de massas (correspondentes a 58 Da x 2) em relação ao peptídeo natural (em condição oxidada), comprovando a presença de 2 resíduos de Cys formadores de ligação dissulfeto.

A sequência desse peptideo foi obtida através de espectros de MS³ após a reação de redução e carbamidometilação (Figura 7C), revelando os íons moleculares carbamidometilados (cmM) com m/z 2232,02 [cmM+H]⁺, seguido pelo íon de m/z 2126,98 (b₂₀), que corresponde à perda de água (18 Da) do íon molecular carbamidometilado.

A série de íons b- completa também foi observada com m/z 1966,98 (b₁₉), 1897,91 (b₁₈), 1867,91 (b₁₇), 1770,86 (b₁₆), 1683,83 (b₁₅), 1596,80 (b₁₄), 1468,74 (b₁₃), 1411,72 (b₁₂), 1314,72 (b₁₁), 1186,72 (b₁₀), 1058,43 (b₉), 930,72 (b₈), 770,37 (b₇), 642,31 (b₆), 514,25 (b₅), 399,22 (b₄), 284,19 (b₃) e 171,11 (b₂). Os íons de MS² precursores dos espectros de MS³ foram: 399.22 como [M+H]⁺, 706.36 como [M+2H]²⁺, 770.37 como [M+H]⁺, 842,41 como [M+2H]²⁺, 1063,74 como [M+2H]²⁺, 1058,43 como [M+H]⁺, 1770,86 como [M+H]⁺. Nesta mesma figura também se verifica a presença de alguns íons da série a- e y-, corroborando com a sequência obtida. A subtração entre os valores de m/z consecutivos permitiram o sequenciamento do peptídeo presente na fração 8, com algumas ambiguidades entre os resíduos isóbaros I/L e K/Q: G-I/L-I/L-D-D-K/Q-K/Q-cmC-K/Q-K/Q-K/Q-P-G-K/Q-S-S-P-V-cmC-S.

É importante enfatizar que os resíduos de Cys foram detectados em sua forma carbamidometilada (cmC; 160 Da) e que o íon b₂ de m/z 171,11 corresponde ao dipeptídeo G-I/L. A observação cuidadosa do espectro apresentado na figura 7C também revela a presença dos íons de m/z 129,10 (d₂), 242,19 (d₃), 2032,90 (w₁₈) e 2145,98 (w₁₉), característicos da fragmentação da cadeia lateral de Ile nas posições 2 e 3 da cadeia

peptídica em questão, eliminando, dessa forma a ambiguidade dessas posições na sequência da fração 8: G-I-I-D-D-K/Q-K/Q-cmC-K/Q-K/Q-K/Q-P-G-K/Q-S-S-P-V-cmC-S.

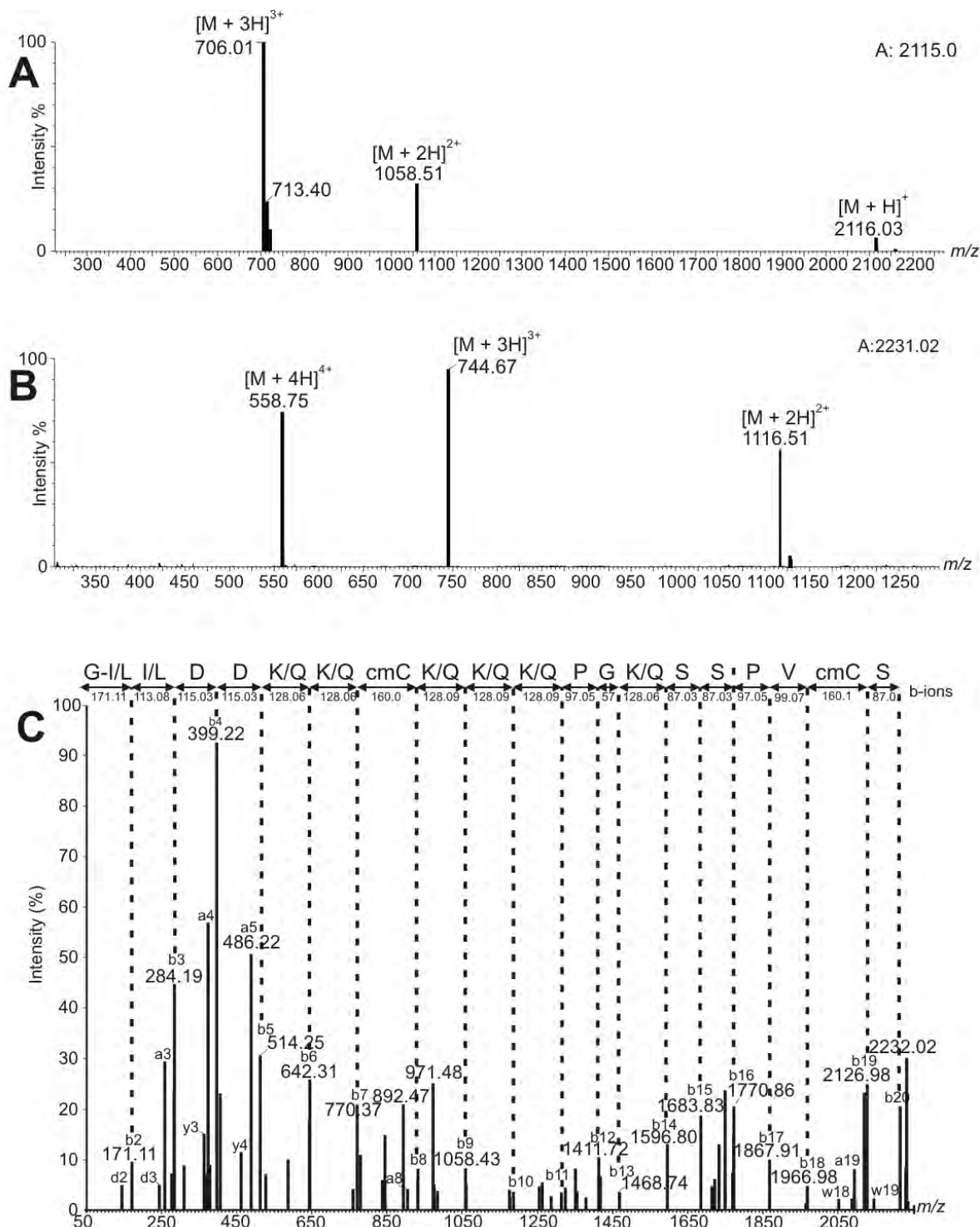


FIGURA 7: A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração 8 em sua forma natural; B) espectro ESI-MS da fração 8 após redução e carboximetilação dos resíduos de cisteína; C) espectro MS³ deconvolvido da fração 8 reduzida e carboxyamida, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

A análise do espectro de MS³ referente ao peptídeo reduzido e acetilado (resultados não mostrados) revelou a presença de Lys nas posições 9, 10 e 11 da cadeia peptídica, sendo que a sequência dessa molécula sem as ambiguidades I/L e K/Q é: G-I-I-D-D-Q-Q-cmC-K-K-K-P-G-Q-S-S-P-V-cmC-S. Finalmente, a massa molecular do peptídeo natural (2115,03 Da) parece ser consistente com o C-terminal ácido sendo que a sequência final completa desse peptídeo presente na fração 8 é: G-I-I-D-D-Q-Q-cmC-K-K-K-P-G-Q-S-S-P-V-cmC-S-OH.

Até o momento, apenas o peptídeo Silverina isolado do veneno da vespa social *Protonectarina sylveirae* (Dohtsu et al 1993) foi descrito no veneno de vespas sociais como apresentando resíduos de Cys formadores de ligação dissulfeto. Por esse motivo, decidiuse por nomear esse peptídeo como Pallipina-I, seguindo a nomeação feita por Dohtsu et al (1993).

A figura 8A mostra o espectro da fração 9a, revelando 4 picos de m/z 1235,22, 823,82, 618,11 e 494,69, correspondentes aos íons moleculares [M + 2H]²⁺, [M+3H]³⁺, [M + 4H]⁴⁺ e [M+5H]⁵⁺, respectivamente. Esses resultados indicam que o peptídeo presente na fração 9a possui massa molecular de 2468,43 Da, sendo que resíduos de Cys formadoras de ligação dissulfeto poderiam contribuir para esse valor de massa molecular. Por isso, promoveu-se a reação desse peptídeo com DTT seguido de carbamidometilação com IAA. A figura 8B apresenta o espectro MS¹ do peptídeo reduzido e carbamidometilado, podendo-se observar quatro picos de m/z 1293,22 [M+2H]²⁺, 862,48 [M+3H]³⁺, 647,11 [M+4H]⁴⁺ e 517,83 [M+5H]⁵⁺. Esses resultados indicam que o peptídeo modificado quimicamente apresenta massa molecular de 2584,45 Da, indicando um aumento de 116 unidades de massas (correspondentes a 58 Da x 2) em relação ao peptídeo natural (em condição oxidada), comprovando a presença de dois resíduos de Cys formadores de ligação dissulfeto.

O seqüenciamento deste peptídeo foi obtido através da análise do espectro de MS³ após reação de redução e carbamidometilação (Figura 8C), que revelou o íon molecular carbamidometilado (cmM) com m/z 2585,50 [cmM+H]⁺, seguido pelo íon molecular de m/z 2568,50 (b₂₁), que corresponde à perda de uma amônia (17 Da) a partir do [cmM+H]⁺. A série completa dos íons do tipo b- também foram observados com m/z 2408,53 (b₂₀), 2261,53 (b₁₉), 2164,42 (b₁₈), 2063,42 (b₁₇), 1962,32 (b₁₆), 1849,24 (b₁₅), 1721,15 (b₁₄), 1608,07 (b₁₃), 1507,02 (b₁₂), 1351,00 (b₁₁), 1222,02 (b₁₀), 1108,80 (b₉), 995,82 (b₈), 867,63 (b₇), 707,53 (b₆), 594,54 (b₅), 466,39 (b₄), 329,33 (b₃) e 201,24 (b₂). Os íons de MS² precursores dos espectros de MS³ foram: 466,39 como [M+H]⁺, 867,63 como [M+H]⁺,

981,66 como $[M+2H]^{2+}$, 1082,71 como $[M+2H]^{2+}$, 1233,66 como $[M+H]^+$, 1284 como $[M+2H]^{2+}$. Também se observou íons a- e y-, corroborando com o sequenciamento obtido.

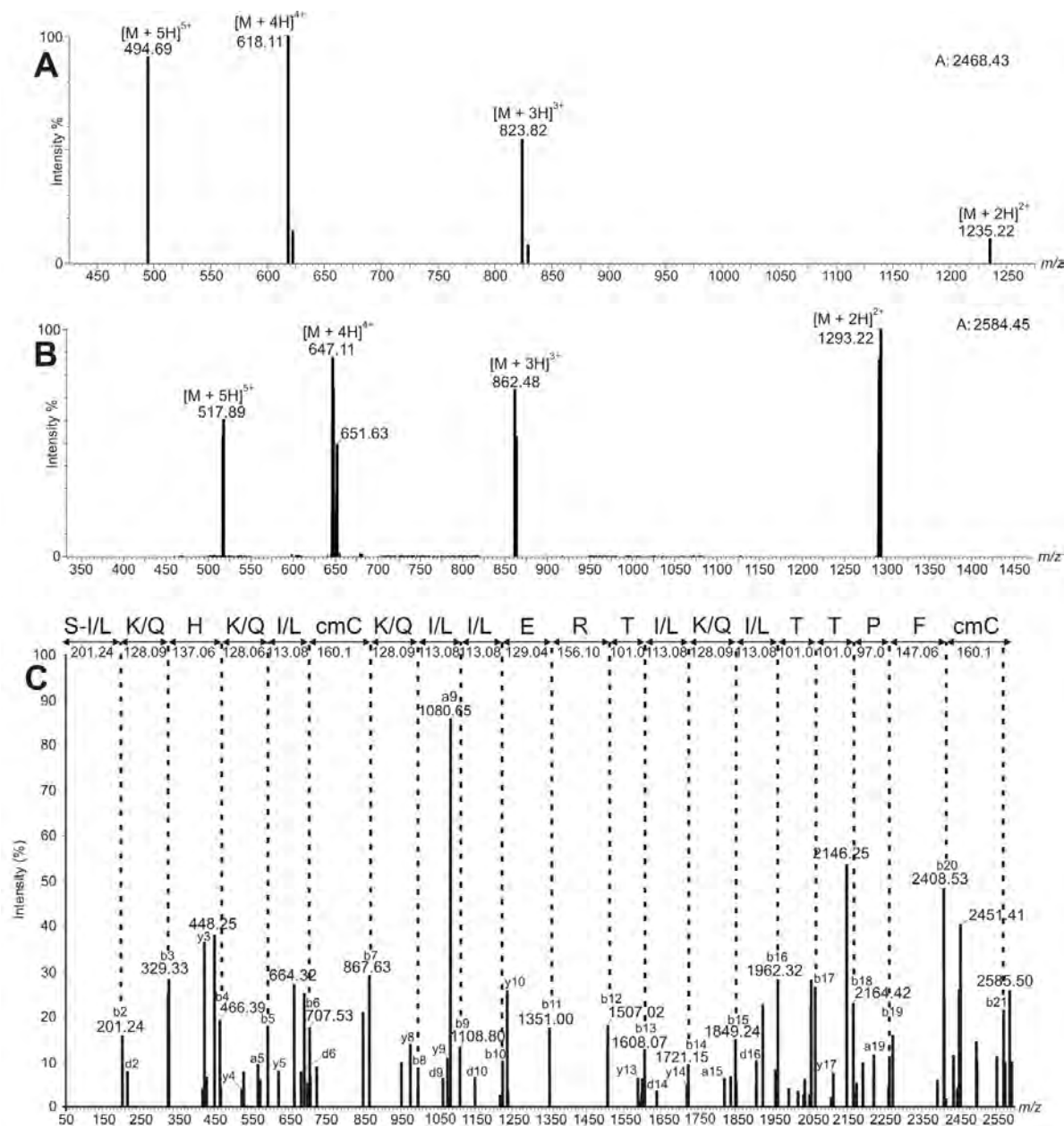


FIGURA 8: A) Espectro ESI-MS da fração 9a na sua forma natural; B) espectro ESI-MS da fração 9a após redução e carboximetilação das pontes dissulfeto; C) espectro MS^3 deconvolvido da fração 9a reduzida e carboxyamidada, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação.

A subtração dos valores de m/z entre os íons do tipo b- consecutivos permitiu o sequenciamento do peptídeo presente na fração 9a, com algumas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q: S-I/L-K/Q-H-K/Q-I/L-cmC-K/Q-I/L-I/L-E-R-T-I/L-K/Q-I/L-T-T-P-F-cmC. É importante enfatizar que os resíduos de cisteína foram

detectados em sua forma carbamidometilada (cmC; 160 Da) e que o íon b_2 de m/z 201.24 corresponde ao dipeptídeo S-I/L.

Além disso, a análise do espectro de MS^3 referente ao peptídeo reduzido e acetilado (dados não mostrados) revelou que a massa molecular do peptídeo modificado aumentou para 2678.43Da (resultado não mostrados), ou seja, com aumento de 210 Da, (correspondendo a 42 Da x 5). Considerando-se que o grupamento amino α do resíduo N-terminal está aparentemente livre, existem na sequência da fração 9a, quatro resíduos de Lys. Ainda nesse espectro, verifica-se que esses resíduos de Lys aparecem nas posições 3, 5, 8 e 15 da cadeia peptídica, sendo que a sequência dessa molécula sem as ambiguidades de K/Q é: S-I/L-K-H-K-I/L-cmC-K-I/L-I/L-E-R-T-I/L-K-I/L-T-T-P-F-cmC.

A observação cuidadosa do espectro apresentado na figura 8C revela a presença dos íons de m/z 159,11 (d_2), 665,45 (d_6) e 1963,04 (w_{16}), característicos da fragmentação da cadeia lateral de Ile nas posições 2 e 6. Também é possível verificar a presença dos íons de m/z 1039,61 (d_9), 1152,69 (d_{10}), 1651,97 (d_{14}) e 1893,15 (d_{16}), característicos da fragmentação das cadeias laterais de Leu nas posições 9, 10, 14 e 16. Além disso, a massa molecular do peptídeo natural (2468,43 Da) parece consistente com o C-terminal amidado; dessa forma, a sequência final completa do peptídeo presente na fração 9a sem as ambiguidade dos resíduos isóbaros é: S-I-K-H-K-I-cmC-K-L-L-E-R-T-L-K-L-T-T-P-F-cmC-NH₂. Seguindo a nomenclatura dada anteriormente para o peptídeo presente estruturalmente caracterizado na fração 8, denominou-se o peptídeo presente na fração 9a como Pallipina-II.

A figura 9A mostra o espectro ESI-MS da fração 9b, onde se pode ser observar dois picos de m/z 629,42 e 651,42, correspondentes aos íons moleculares $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente. A figura 9B mostra o espectro MS^2 do íon molecular precursor de m/z 629,42. A perda de água (18 Da) do íon molecular $[M + H]^+$ gerou o pico de m/z 611,39 (b_6). A série completa de íons do tipo b- também é observada com m/z 498,33 (b_5), 385,25 (b_4), 284,20 (b_3) e 227,18 (b_2). A subtração entre os valores de m/z dos íons b- consecutivos permitiu o sequenciamento do peptídeo presente na fração 9b, com algumas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L: I/L-I/L-G-T-I/L-I/L.

A figura 9B também revela o fragmento iônico de m/z 442,30 (d_5), resultante da fragmentação da cadeia lateral do resíduo de Ile na posição 5 da cadeia peptídica, enquanto que o íon de m/z and 157,13 (d_2) indica a presença de Leu na posição 2 da cadeia peptídica. No entanto, a ambiguidade relacionada com os resíduos I/L presentes nas posições N- e C-terminais permaneceu; por isso, sintetizou-se quatro peptídeos

alternando-se os resíduos Ile ou Leu nas posições terminais, e os tempos de retenção para cada peptídeo sintético e para o natural foram obtidos usando RP-HPLC (C18) (250 x 4,6mm, 5 μ m) com eluição isocrática em acetonitrila 31 % (v/v) (contendo 0,1 % de TFA), a um fluxo de 2 mL/min durante 25 min a 30°C (resultados não mostrados).

O tempo de retenção de 23,10 minutos do peptídeo sintético com sequência I-L-G-T-I-L correspondeu ao mesmo tempo de retenção do peptídeo natural, indicando que o resíduo presente em ambas as posições correspondem a Ile. A massa molecular desse peptídeo natural (628,42 Da) parece consistente com o resíduo C-terminal na forma ácida, sendo então I-L-G-T-I-L-OH, a sequência completa final desta molécula.

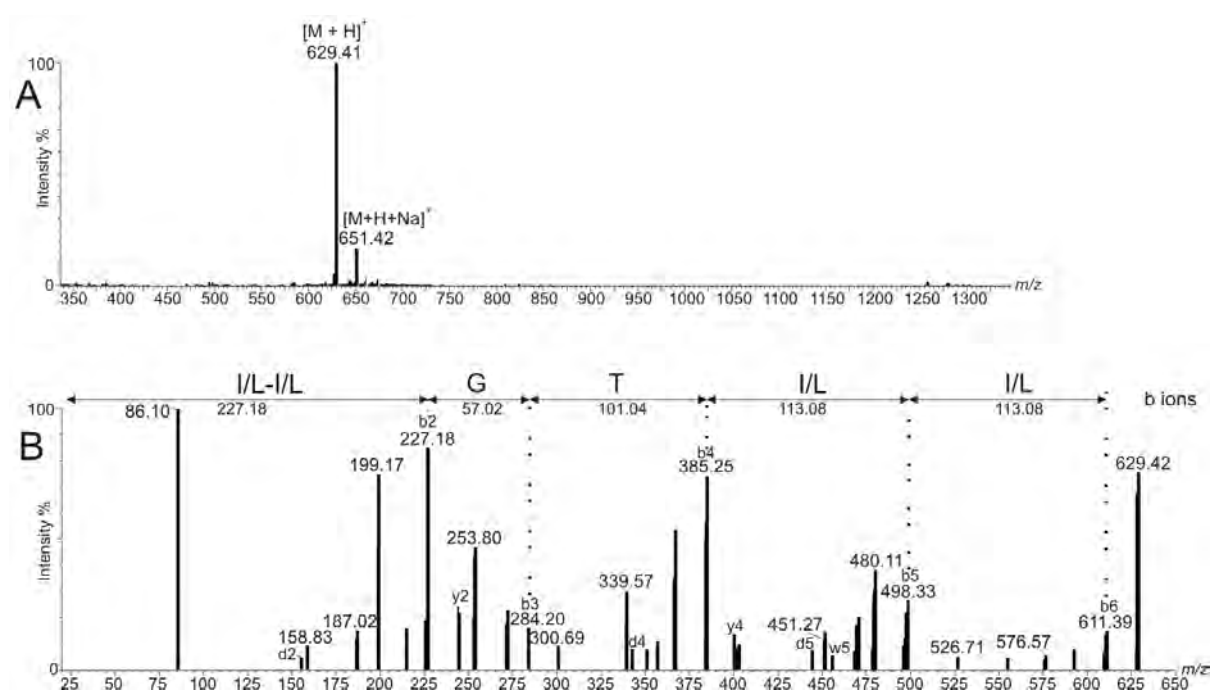


FIGURA 9: A) Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 9b. B) espectro de massas MS² da fração 9b, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

Esse peptídeo foi denominado como Protonectina (1-6)-OH uma vez que ele corresponde aos seis primeiros resíduos de aminoácidos do peptídeo Protonectina (Dothsu et al 1993, Mendes et al 2004). Além disso, essa sequência é a mesma já descrita para o peptídeo Protonectina (1-6) descrito por Baptista-Saidemberg et al (2010), neste caso, com o C-terminal amidado.

A Tabela 8 mostra as características das sequências primárias dos peptídeos Protonectina, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-4)-OH e Protonectina (7-12) alinhados.

Com base nestes resultados é possível observar que os peptídeos pequenos isolados no presente trabalho, aparentemente correspondem a “fragmentos” do peptídeo Protonectina, e não dos demais peptídeos maiores.

Uma vez que se isolou apenas “fragmentos” de um único tipo peptídico, e devido ao fato de que diferentes lotes de glândulas foram extraídos e fracionados separadamente, tendo os cromatogramas reproduzidos, descartou-se a hipótese de lise química dessa molécula durante a manipulação; entretanto, permanece a possibilidade de que estes peptídeos menores sejam produtos da ação de alguma protease sobre o peptídeo maior, a Protonectina.

TABELA 8: Alinhamento entre os peptídeos Protonectina, Protonectina (1-6)-OH e Protonectina (7-12), todos isolados dos venenos de vespas do gênero *Agelaia*.

I L G T I L G L L K G L NH ₂	Protonectina
I L G T I L	Protonectina (1-6)
I L G T I L	Protonectina (1-6)-OH
I L G T I	Protonectina (1-5)-OH
I L G T	Protonectina (1-4)-OH
G L L K G L NH ₂	Protonectina (7-12)

A esse respeito, questiona-se: por que e para que, somente esse peptídeo é fragmentado? Qual (is) a(s) possível (is) função (ões) desse (s) fragmento (s)?

Sabe-se que o peptídeo Protonectina possui ações de hemólise, desgranulação de mastócitos, quimiotaxia e antibiose, enquanto que o peptídeo Protonectina (1-6), também isolado do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, apresenta somente a atividade quimiotática (Baptista-Saidemberg et al 2010).

Além disso, quando misturado à Protonectina (proporção estequiométrica de 1:1), a Protonectina (1-6) potencializa todas as atividades apresentadas pela Protonectina, exceto a atividade quimiotática (Baptista-Saidemberg et al 2010), sugerindo que o mesmo possa de alguma maneira, interagir com receptores acoplados a proteínas-G (Baptista-Saidemberg et al 2010).

Portanto, até o momento, a hipótese mais provável para explicar este fenômeno é a de que os peptídeos são clivados por alguma enzima proteolítica. Este comportamento foi descrito por Xu et al (2006), num estudo que isolou do veneno de *Vespa magnífica*, diferentes partes dos peptídeos 5e e 12a. No entanto, neste estudo não se apontou um provável mecanismo para explicar esse fenômeno.

A figura 10A mostra o espectro ESI-MS da fração 10, revelando 5 picos de m/z 2481,41, 1241,20, 827,80, 621,02 e 497,03, correspondentes aos íons moleculares $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$ e $[M+5H]^{5+}$, respectivamente. Esses resultados indicam que a massa molecular desse peptídeo é de 2480,41 Da, sendo que esse valor poderia ter contribuição da presença de resíduos de Cys formadores de ligações dissulfeto. Por isso, reagiu-se a fração 10 com DTT seguido de carbamidometilação com IAA.

A figura 10B mostra o espectro MS^1 do peptídeo reduzido e carbamidometilado, onde é possível verificar quatro picos com m/z 1299,20 $[M+2H]^{2+}$, 866,46 $[M+3H]^{3+}$, 650,10 $[M+4H]^{4+}$ e 520,28 $[M+5H]^{5+}$. Esses dados indicam que o peptídeo quimicamente modificado apresentou massa molecular de 2596,40 Da, ou seja, com um aumento de 116 unidades de massa (correspondentes a 58 Da x 2) no valor da massa molecular do peptídeo natural. Dessa forma, comprova-se a presença de dois resíduos de Cys formadores de ligação dissulfeto no peptídeo presente na fração 10.

O sequenciamento deste peptídeo pode ser observado no espectro deconvolvido MS^3 (Figura 10C) após a redução e carbamidometilação. Essa figura revela o íon molecular carbamidometilado (cmM) de m/z 2597,41 como $[cmM+H]^+$, seguido do íon de m/z 2580,39 (b_{22}), que corresponde a perda de amônia (17 Da) do íon $[cmM+H]^+$ íon. A sequência completa de íons b- apresentam m/z 2420,40 (b_{21}), 2273,36 (b_{20}), 2176,16 (b_{19}), 2063,39 (b_{18}), 1935,06 (b_{17}), 1848,39 (b_{16}), 1791,38 (b_{15}), 1734,10 (b_{14}), 1577,94 (b_{13}), 1421,84 (b_{12}), 1292,80 (b_{11}), 1180,00 (b_{10}), 1066,70 (b_9), 995,82 (b_8), 882,40 (b_7), 722,46 (b_6), 594,40 (b_5), 457,34 (b_4), 329,25 (b_3) e 201,13 (b_2). Os íons de MS^2 precursores dos espectros de MS^3 foram: 519,80 como $[M+2H]^{2+}$, 549,4 como $[M+H]^+$, 867,52 como $[M+2H]^{2+}$, 882,4 como $[M+H]^+$, 995,48 como $[M+H]^+$, 1231,72 como $[M+H]^+$, 1290,69 como $[M+2H]^{2+}$, 1939,13 como $[M+H]^+$, 2176,16 como $[M+H]^+$. Também se observa alguns íons pertencentes às séries a- e y-, que corroboram com o sequenciamento obtido.

A subtração dos valores de m/z dos íons do tipo b- consecutivos permitiram a realização do sequenciamento do peptídeo presente na fração 10 com algumas ambiguidades relacionadas com os resíduos isóbaros I/L e K/Q: S-I/L-K/Q-K/Q-H-K/Q-cmC-I/L-A-I/L-I/L-E-R-R-G-G-S-K/Q-I/L-P-F-cmC. É importante enfatizar que os resíduos de Cys foram detectados em sua forma carbamidometilada (cmC; 160 Da) e que o íon de m/z 201.13 (b_2) corresponde ao dipeptídeo S-I/L.

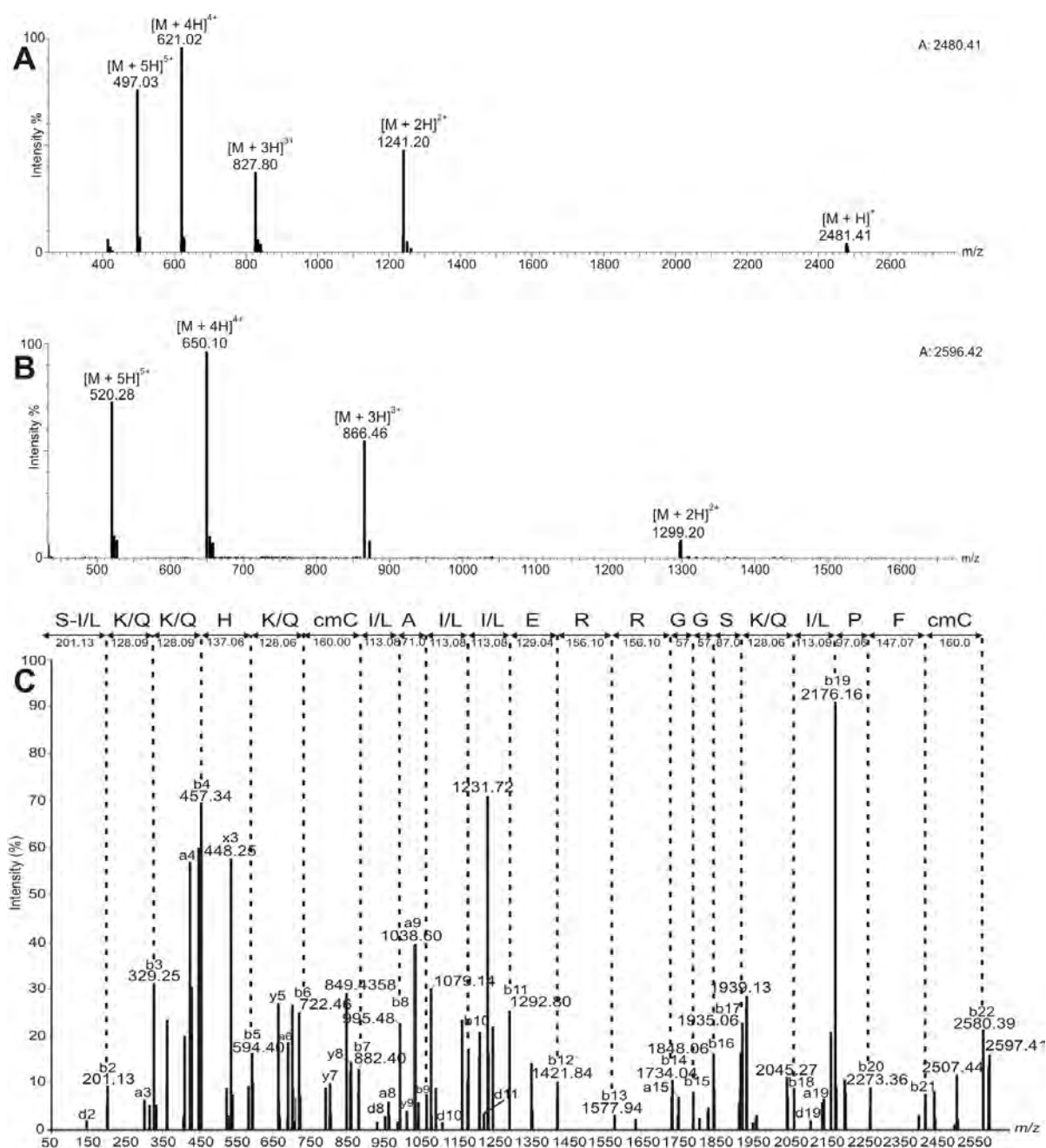


FIGURA 10: Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração App-10. Espectro ESI-MS/MS da Pallipina-III, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos. Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração App-10a. A) ESI-MS da Pallipina-III natural e B) ESI-MS da Pallipina-III após redução e carboximetilação das pontes dissulfeto, mostrando que a diferença entre a massa do peptídeo natural apresentou um aumento de 116 unidades de massas, indicando a presença de 2 resíduos de cisteína na molécula.

O peptídeo intacto foi acetilado, ocorrendo o aumento da massa molecular para 2690.40 Da (com aumento de 210 Da, correspondendo a 42 Da x 5), indicando a presença de quatro resíduos de Lys na sequência primária do peptídeo. O espectro MS³ do peptídeo acetilado (resultados não mostrados) revelou a presença de Lys nas posições 3, 4, 6 e 18 na cadeia peptídica dessa molécula. Além disso, a massa molecular do peptídeo natural

(2480.41 Da) parece consistente com o resíduo C-terminal na forma amidada; assim a sequência final completa do peptídeo presente na fração 10 é S-I/L-K-K-H-K-cmC-I/L-A-I/L-I/L-E-R-R-G-G-S-K-I/L-P-F-cmC-NH₂.

Seguindo a nomenclatura dada anteriormente para os peptídeos estruturalmente caracterizados nas frações 8 e 9, denominou-se o peptídeo presente na fração 10 como Pallipina-III.

Realizou-se o alinhamento das sequências dos peptídeos Pallipina-I, Pallipina-II e Pallipina-III (Tabela 9) a fim de se comparar essas sequências com as sequências mencionadas na tabela 9 utilizando-se o programa MULTIALIGN (Corpet 1988).

TABELA 9: Alinhamento dos peptídeos com resíduos de cisteína isolados das vespas sociais *Protonectaria silveirae*, *Protopolybia sedula*, *Synoeca cyanea*, *Polybia paulista*, *Protopolybia exígua* e *Agelaia pallipes pallipes*, utilizando-se o programa MULTIALIGN (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>).

	1	10	20	23
Silverina	- - S K G K I C K I I G - K I G K K P P F C P			OH
Sedulina	- - S K G K I C K I I G A K I G K K P P - C P			OH
Cyanina	- G L K D - L C K I L E A K F G K K L P F C P			OH
Polybina	- S I K D K I C K I I Q A Q C G K K L P F V -			NH ₂
Exiguina	- S I K D K I C K I L U - A K I G K K P P I C			OH
Pallipina-I	G I I D D Q Q C K - - - K K P G Q S S P V C S			OH
Pallipina-II	- S I K H K I C K L L E R T L K L T T P F C -			NH ₂
Pallipina-III	S I K K H K C I A L L K R R G G S K L P F C -			NH ₂
Pallipina-IV	- S I K H K I C - L I E R K I G I K L P F C -			OH
CONSENSUS	- - I K D K - C K - - - - K - G - K - P F C -			

No que diz respeito às sequências das Pallipinas pode-se dizer que elas estão relativamente conservadas umas em relação às outras. Além disso, os peptídeos Polybina e Pallipinas-II e -III possuem o resíduo C-terminal amidado, enquanto que os demais peptídeos desta família apresentam o resíduo C-terminal na forma ácida.

A figura 11A mostra o espectro de ESI-MS da fração 11 revelando dois picos de m/z 1566,96 e m/z 783,98, correspondentes aos íons moleculares [M+H]⁺ e [M+2H]²⁺, respectivamente. A figura 11B mostra o espectro MS² do íon precursor de m/z 1566.98. A perda de amônia (17 Da) do íon molecular [M+H]⁺ gerou o íon de m/z 1549,97 (b₁₄). A série completa de íons tipo b- também pode ser observada com m/z 1436,88 (b₁₃), 1365,96 (b₁₂), 1250,97 (b₁₁), 1137,69 (b₁₀), 1024,61 (b₉), 953,97 (b₈), 825,47 (b₇), 768,45 (b₆), 655,37 (b₅), 527,97 (b₄), 414,20 (b₃) e 228,13 (b₂).

A subtração entre os valores de m/z dos íons b- consecutivos permitiu o

sequenciamento do peptídeo presente na fração 11 com algumas ambiguidades em relação aos resíduos isóbaros I/L e K/Q: I/L-N-W-I/L-K/Q-I/L-G-K/Q-A-I/L-I/L-D-A-I/I/L. O íon de m/z 228,13 corresponde ao dipeptídeo I/L-N.

O peptídeo intacto foi acetilado, observando-se um aumento da massa molecular para 1691,98 Da (com aumento de 126 Da, correspondendo a 42 Da x 3). A interpretação do espectro MS^2 do peptídeo acetilado (resultados não mostrados), revelou a presença de Lys nas posições 5 e 8 na cadeia peptídica dessa molécula.

A figura 11B revela os íons fragmento de m/z 1081,69 (d_{10}) e 1194,77 (d_{11}), resultantes da fragmentação da cadeia lateral dos resíduos de Ile nas posições 10 e 11 da cadeia peptídica, enquanto que os íons de m/z 457,26 (d_4) e 698,44 (d_6) indicando a presença de Leu nas posições 4 e 6 da cadeia peptídica da fração 11.

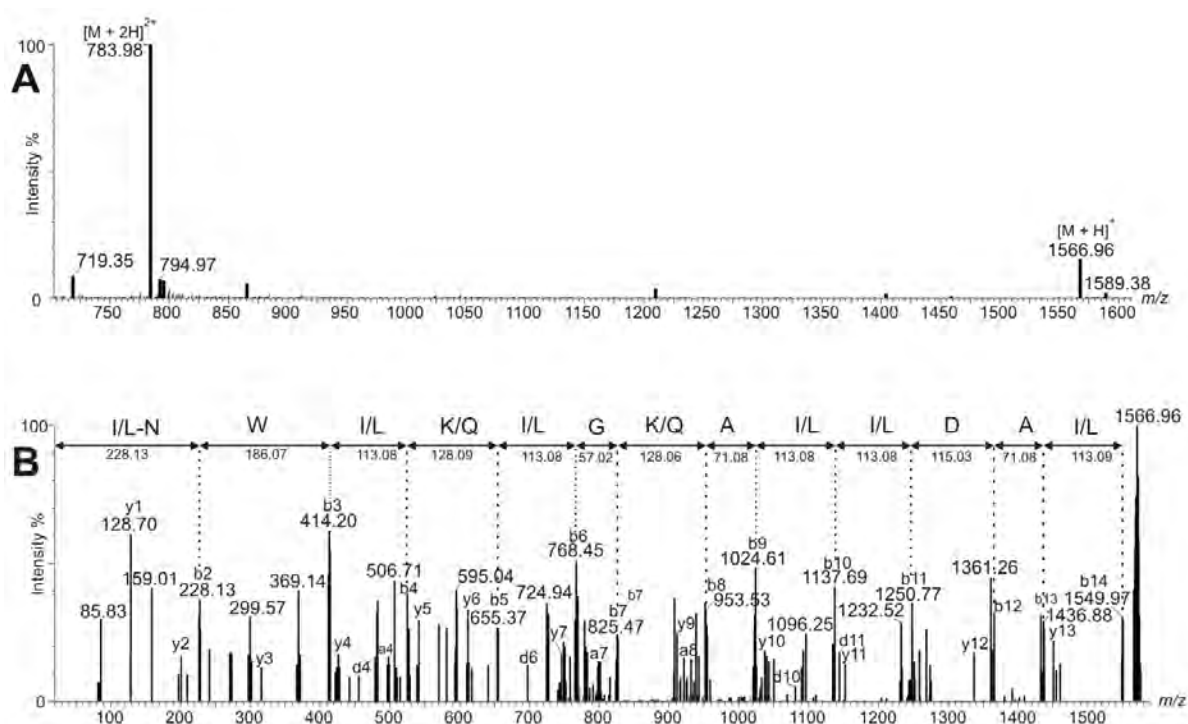


FIGURA 11: A) Espectro de massas do tipo ESI-MS da fração 11. B) espectro MS^2 da fração 11, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

Por fim, a massa molecular do peptídeo natural (1565,96 Da) parece ser consistente com o resíduo C-terminal da forma amidada, dessa forma, a sequência completa final do peptídeo identificado na fração 11 é I-N-W-L-K-L-G-K-A-I-I-D-A-L-NH₂. Esse peptídeo, denominado Agelaia MP-I, é o mesmo previamente descrito por Mendes et al 2004, para o veneno também da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*.

A figura 12A mostra o espectro ESI-MS da fração 12 revelando quatro picos de m/z 1754,11, 877,55, 585,37 e 439,27, correspondentes aos íons moleculares $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$ e $[M+4H]^{4+}$, respectivamente; enquanto que a figura 12B mostra o espectro MS^2 do íon molecular precursor de m/z 1754,11. A perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular $[M + H]^+$ gerou o íon de m/z 1737,03 (b_{14}). A série completa dos íons do tipo b- também pode ser observada com m/z 1624,05 (b_{13}), 1493,01 (b_{12}), 1365,12 (b_{11}), 1237,20 (b_{10}), 1124,10 (b_9), 968,15 (b_8), 840,05 (b_7), 727,08 (b_6), 614,20 (b_5), 543,10 (b_4), 415,02 (b_3) e 229,01 (b_2). A subtração entre os valores de m/z dos íons b- consecutivos permitiram o sequenciamento do peptídeo presente na fração 12 com algumas poucas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q: I/L-N-W-K/Q-A-I/L-I/L-K/Q-R-I/L-K/Q-K/Q-M-I/L. O íon de m/z 229,01 corresponde ao dipeptídeo I/L-N.

A figura 12B também revela os íon-fragmentos de m/z 684,42 (d_6) e 1194,75 (d_{10}), resultantes da fragmentação da cadeia lateral dos resíduos de Ile nas posições 6 e 10 da cadeia peptídica, enquanto que o íon de m/z 769,47 (d_7) indica a presença de Leu na posição 7 da cadeia peptídica.

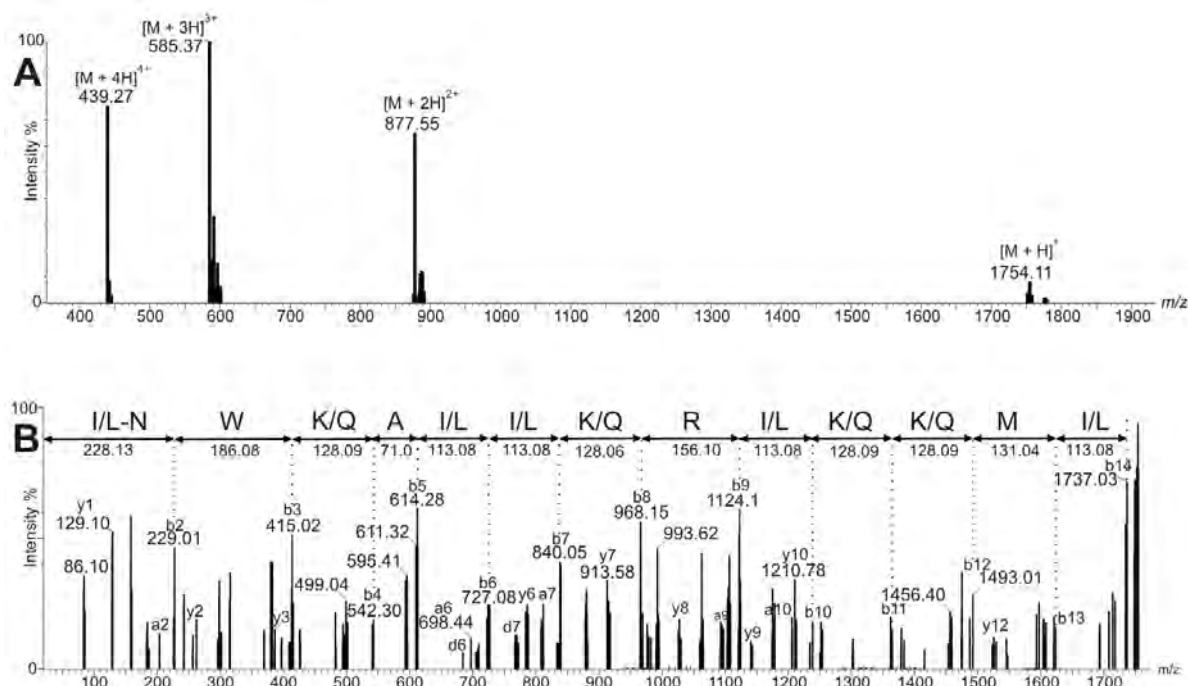


FIGURA 12: A) Espectros de massas do tipo ESI-MS da fração 12; B) espectro MS^2 da fração 12, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

O peptídeo intacto foi acetilado, revelando um aumento da massa molecular para 1921.11 Da (com aumento de 168 Da, correspondendo a 42 Da x 4). A interpretação do

espectro MS² do peptídeo acetilado (resultados não mostrados) permitiu a identificação da presença de Lys nas posições 4, 10 e 11 na cadeia peptídica dessa molécula, enquanto que a posição 8 é ocupada pelo resíduo de Gln.

A figura 12B revela os íon-fragmentos de m/z 1081,69 (d₁₀) e 1194,77 (d₁₁), resultantes da fragmentação da cadeia lateral dos resíduos de Ile nas posições 10 e 11 da cadeia peptídica, enquanto que os íons de m/z 457,26 (d₄) e 698,44 (d₆) indicam a presença de Leu nas posições 4 e 6 da cadeia peptídica da fração 11.

No entanto, ainda permaneceu a dúvida com relação à ambiguidade do resíduo I/L presentes nas posições N- e C-terminais dessa sequência. Por isso, os tempos de retenção para cada peptídeo sintético e natural foram obtidos utilizando-se RP-HPLC (C18) (250 x 4,6mm, 5 µm) com eluição isocrática em acetonitrila 32 % (v/v) (contendo 0,1 % de TFA), a um fluxo de 2 mL/min durante 25 min a 30°C (resultados não mostrados).

O tempo de retenção de 24,80 minutos do peptídeo sintético com sequência I-N-W-L-K/Q-L-G-K/Q-A-I-I-D-A-L correspondeu ao mesmo tempo de retenção do peptídeo natural, indicando que o resíduo presente na posição N-terminal corresponde a Ile enquanto que o resíduo presente na posição C-terminal corresponde a Leu. Além disso, a massa molecular do peptídeo natural (1753,11 Da) parece consistente com o resíduo C-terminal amidado, e, portanto a sequência final completa do peptídeo presente na fração 12 é: I-N-W-K-A-I-L-Q-R-I-K-K-M-L-NH₂.

Uma vez que a sequência dessa molécula assemelha-se com as sequências dos mastoparanos clássicos, e já existe um peptídeo dessa natureza identificado como Agelaia MP-I, denominou-se o peptídeo da fração 12 como Agelaia MP-II.

A tabela 10 mostra as características dos peptídeos isolados no veneno da vespa social *A. P. Pallipes*.

TABELA 10: Sequências de aminoácidos de cada peptídeo purificado do veneno da vespa social *A. p. Pallipes*.

Frações	Sequência da Estrutura Primária	C-Terminal	m/z [M+H] ⁺	Massa teórica [M+H] ⁺
App-5b	ILGT	OH	403.3	403,2
App-6a	GLLKGL	NH ₂	599.5	599,4
App-7a	ILGTI	OH	516.4	516,3
App-8a	GIIDDQQCCKKPGQSSPVCS	OH	2116.0	2116.0
App-9b	SIKHKICKLLERTLKLTPFC	NH ₂	2469.4	2469.4
App-9c	ILGTIL	OH	629.5	629,4
App-10a	SIKHKKCIALLERRGGSKL PFC	NH ₂	2481.4	2481.4
App-11a	INWKAILQRIKKML	NH ₂	1754.1	1754,1
App-12b	INWLKLGKAIIDAL	NH ₂	1566.9	1566,9

As diversas moléculas, tanto de baixas massas moleculares como peptídicas isoladas a partir do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* são mostradas na figura 13 (Saidemberg 2009, Saidemberg et al 2010), mostrando a riqueza de compostos presentes no veneno dessa vespa.

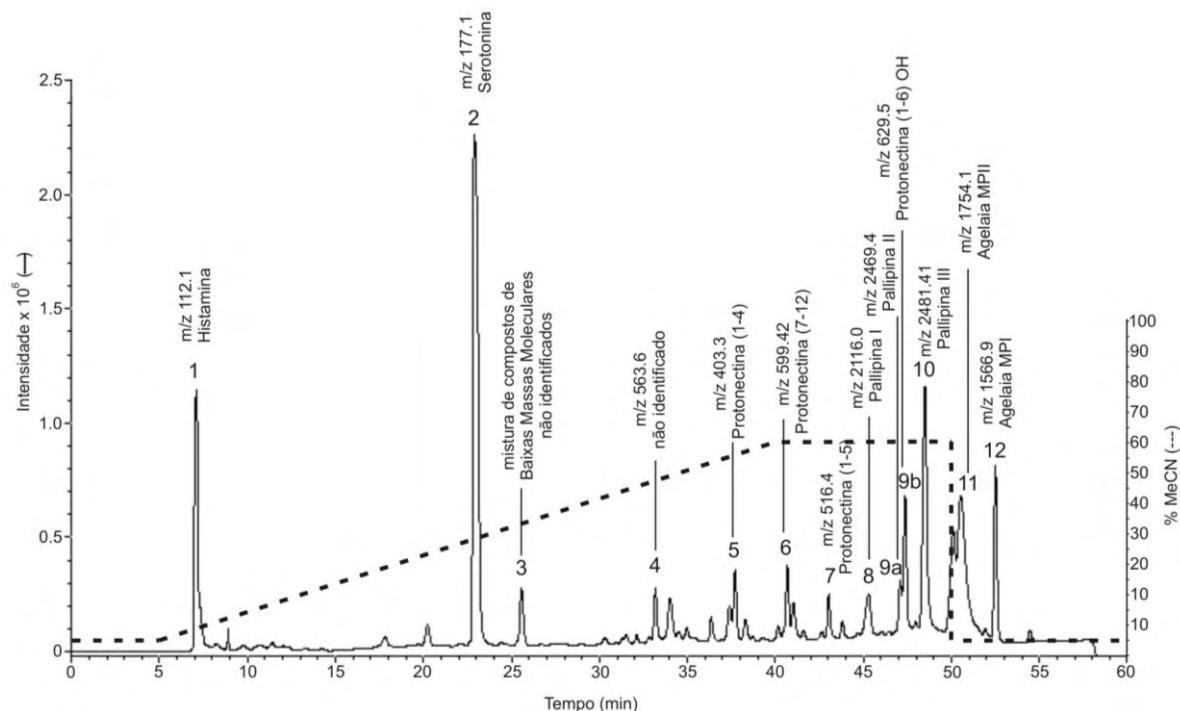


FIGURA 13: Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de *A. p. pallipes*, mostrando as identificações obtidas. **Referências:** Saidemberg 2009; Saidemberg et al 2010, Baptista-Saidemberg et al 2010.

5.1.3 MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA

Além das propriedades estruturais dos peptídeos, a diferença em composição das membranas celulares é uma característica importante para a atividade seletiva de formação de poros, quando se considera a interação peptídeo-membrana (Moerman et al 2002). As faces externas das membranas bacterianas contém fosfolípidos carregados negativamente, enquanto que a maioria dos fosfolípidos aniônicos presentes nas membranas das células dos mamíferos é sequestrada para a face citoplasmática da membrana celular (Epand e Vogel 1999).

Estas observações sugerem que peptídeos policationicos devem interagir fortemente com membranas bacterianas, facilitado pelas interações eletrostáticas entre as cargas opostas dos peptídeos e das membranas das bactérias (Moerman et al 2002). Além disso, o colesterol presente nas membranas eucarióticas (cerca de 25% do total,

dependendo do tipo celular) tem uma atividade protetora contra os peptídeos formadores de poros (Nelson e Cox 2000, Matsuzaki et al 1995).

A figura 14 mostra a representação anfifílica (*helical well*) dos peptídeos Agelaia MP-I (Figura 14A) e Agelaia MP-II (Figura 14B). Nesta representação é possível observar que ambos os peptídeos apresentam face hidrofóbicas e hidrofílicas bem definidas, separadas pelas linhas pontilhadas. Na face hidrofílica (que apresenta índice hidropático negativo) existem um ou dois resíduos hidrofílicos (verde) e de dois a quatro resíduos carregados positivamente (vermelho). Já na face hidrofóbica, aparecem de seis a sete resíduos hidrofóbicos constituindo a outra face.

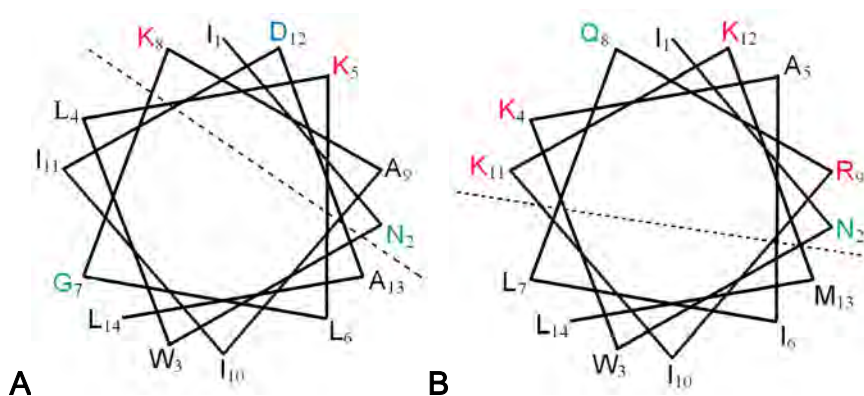


FIGURA 14: Esquema mostrando a distribuição anfifílica (*helical well*) dos peptídeos (A) Agelaia MP-I e (B) Agelaia MP-II. Legenda das cores: Em **verde**, resíduos hidrofílicos; em **vermelho**, resíduos positivamente carregados; em **azul**, resíduos negativamente carregados e em **preto**, resíduos hidrofóbicos.

Tais representações se baseiam em modelos hipotéticos ideais, sugerindo que, ambos os peptídeos possuem estrutura anfipática, sendo esta uma característica de grande importância em suas atividades biológicas específicas. Entretanto, é importante ressaltar que, em situações reais, existem várias interações possíveis entre o esqueleto do carbono α e/ou das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos dos peptídeos com o meio, que pode, por sua vez, afetar fortemente estas estruturas secundárias. Além disso, a estrutura anfifílica dos peptídeos constitui um importante quesito na adsorção, inserção e translocação desses peptídeos às membranas (Matsuzaki et al 1999).

Alguns mastoparanos parecem ser capazes de passar rapidamente através das membranas celulares e interagir com proteínas citoplasmáticas (Hori et al 2001). Em vesículas sintéticas e membranas planares sintéticas já foi relatado a formação de poros e alteração de permeabilidade dessas membranas (Katsu et al 1900, Danilenko et al 1993, Mellor e Sansom 1990). Entretanto não existem informações detalhadas sobre a

flexibilidade conformacional e orientação da hélice dos mastoparanos em bicamadas lipídicas mistas, assim como, dos aspectos dinâmicos da penetração nas membranas (Hori et al 2001).

Muitas vezes, informações estruturais, energéticas e dinâmicas, em nível atômico, de biomoléculas de grande mobilidade não podem ser elucidadas através de técnicas experimentais, como espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear (van Gunsteren e Mark 1992). Nestes casos, uma alternativa é a utilização de métodos teóricos que possibilitem uma investigação detalhada dos aspectos moleculares em questão. Se o método teórico utilizado for suficientemente adequado para prever as propriedades de sistemas biológicos, eles passam a ser viáveis nos estudos das propriedades moleculares com certa resolução espacial, energética e temporal, que não poderia ser alcançada experimentalmente (van Gunsteren e Mark 1992).

Para a determinação da estrutura tridimensional dos peptídeos Agelaia MP-I, Agelaia MP-II e Pallipina-I, realizou-se a modelagem molecular por homologia. Utilizando-se do alinhamento das sequências primárias dos peptídeos mastoparanos e de moléculas cíclicas já descritos na literatura, foi possível escolher um molde (*template*) para realizar a modelagem da estrutura tridimensional dos peptídeos do presente estudo.

Para a modelagem dos peptídeos mastoparanos, os moldes escolhidos foram o do peptídeo Mastoparano-X (PDB:1A13), cuja estrutura resolvida por ressonância magnética nuclear (NMR) (Todokoro et al 2006), para o Agelaia MP-I; e uma região (34 – 46) da glicoproteína CD3 (PDB: 1XIW, cadeia B), resolvida por difração de raio X numa resolução de 1.90 Å (Arnett et al 2004), para o Agelaia MP-II.

Para a modelagem da Pallipina-I, o molde escolhido foi uma região (135 -154) da proteína lectina (PDB: 1G1T, cadeia A), resolvida por difração de raio X numa resolução de 1.5 (Somers et al 2000). Nesse caso, o molde utilizado foi de um peptídeo carboxiamidado, sendo que amidação no terminal-C foi tratado pelo programa como um ligante no peptídeo básico. O peptídeo ácido foi modelado na ausência do ligante, ou seja, na ausência das coordenadas atômicas da molécula NH₂.

A tabela 11 apresenta os códigos de acesso ao PDB dos moldes escolhidos, os valores de identidade e similaridade entre as sequências dos peptídeos do presente estudo e as sequências das moléculas utilizadas como molde, assim como também o método de resolução de cada molde.

A identidade e similaridade apresentada entre as sequências primárias dos moldes e das sequências primárias dos peptídeos em estudo indicam que estas estruturas

tridimensionais escolhidas são bons moldes, uma vez que a precisão na modelagem molecular por homologia de peptídeos está relacionada à porcentagem de identidade na qual o modelo é baseado, estabelecendo, dessa forma, uma correlação entre a similaridade estrutural e sequencial de ambos peptídeos (Sanchez et al 1998, Koehl 1999, Marti-Renom et al 2000).

TABELA 11: Códigos de acesso ao PDB dos moldes escolhidos; os valores de identidade e similaridade entre as sequências dos peptídeos do presente estudo e as sequências dos peptídeos utilizados como molde, assim como também o método de resolução de cada molde.

Peptídeos	Template	Acesso	Identidade (%)	Similaridade (%)	Resolução Tridimensional
Agelaia MP-I	Mastoparan-X (MP-X)	1A13	58	65	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
Agelaia MP-II	T-cell surface glycoprotein CD3 ϵ chain	1XIW	50	61	Difração de Raio X
Pallipina-I	Lectin	1G1T	43	55	Difração de Raio X

Foram gerados 1000 modelos de cada peptídeo, e a escolha do melhor modelo foi baseada na qualidade estereoquímica utilizando o programa PROCHECK (Laskowski et al 1993) e também a função objetiva do MODELLER (Sali et al 1993). A imagem da estrutura tridimensional dos modelos foi gerada a partir do programa PyMOL (Delano 2002), e está ilustrada na figura 15 que mostra as estruturas secundárias dos peptídeos Agelaia MP-I (Figuras 15A, 16A), MP-II (Figuras 15B, 16B) e Pallipina-I (Figura 15C, 16C) com as respectivas densidades superficiais de cargas.

O peptídeo Agelaia MP-I apresenta-se estruturado em hélice α do resíduo Trp3 ao Leu14 (Figura 15A) enquanto que os peptídeos Agelaia MP-II (Figura 15B) e Pallipina-I (Figura 15C) não apresentam formação de hélice α . A diferença observada entre as estruturas tridimensionais dos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II não se deve principalmente devido as diferenças químicas entre os resíduos de aminoácidos que compõem cada uma das sequências.

Já na figura 16, os resíduos de carga neutra são representados na zona em branco, os de carga positiva na azul e os de carga negativa na vermelha. Ainda é possível verificar que, no caso do peptídeo Agelaia MP-I os resíduos hidrofóbicos estão voltados em uma face oposta aos resíduos hidrofílicos, formando uma hélice α anfipática. Essa estrutura é conhecida por promover a interação dessas moléculas com membrana e já foi descrito como presente em diversos outros peptídeos, como por exemplo, a Mellitina, peptídeo isolado do veneno de Apis (Sengupta et al 2008).

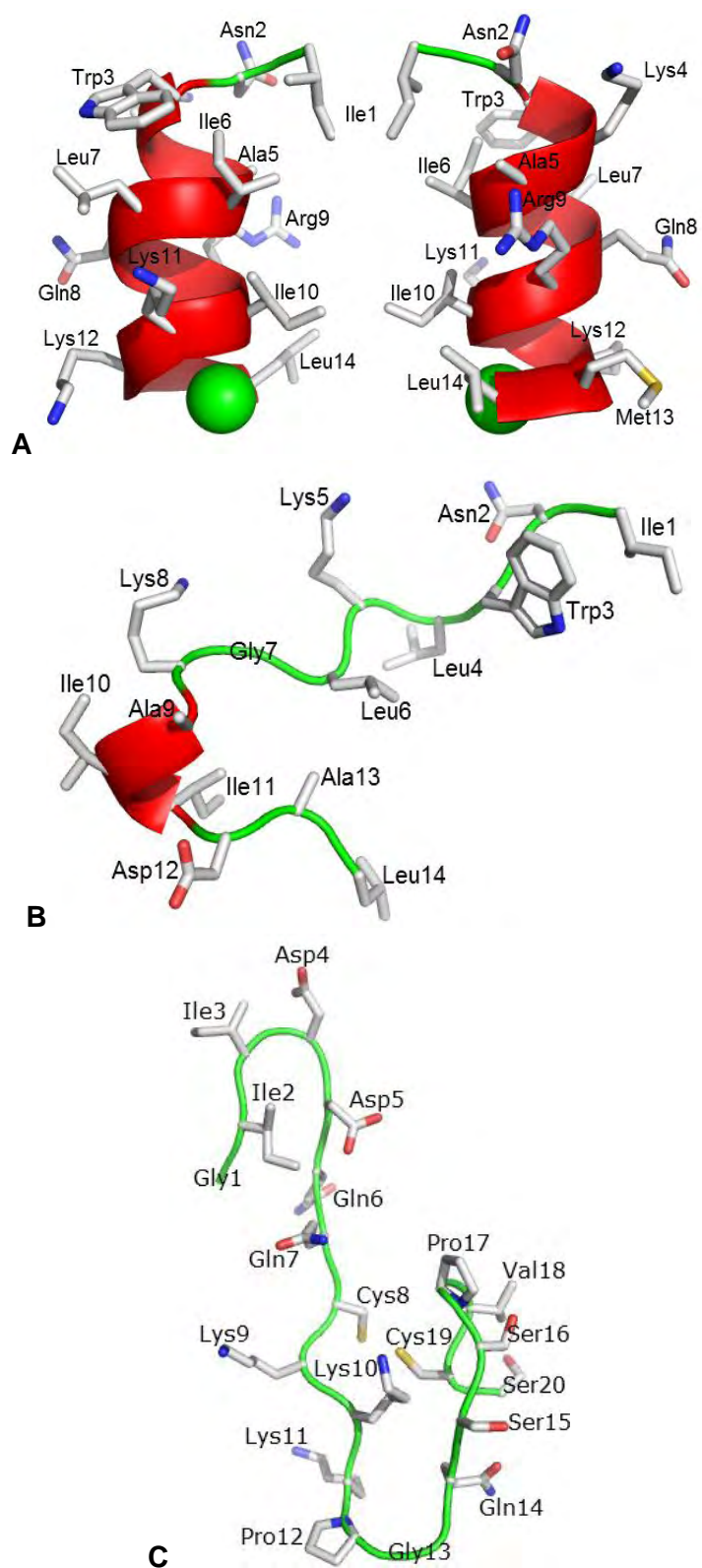


FIGURA 15: Imagens geradas pelo programa MolMol da estrutura secundária (em ribbon) dos peptídeos Agelaia MP-I, representado em duas faces (A); Agelaia MP-II (B) e Pallipina-I (C).

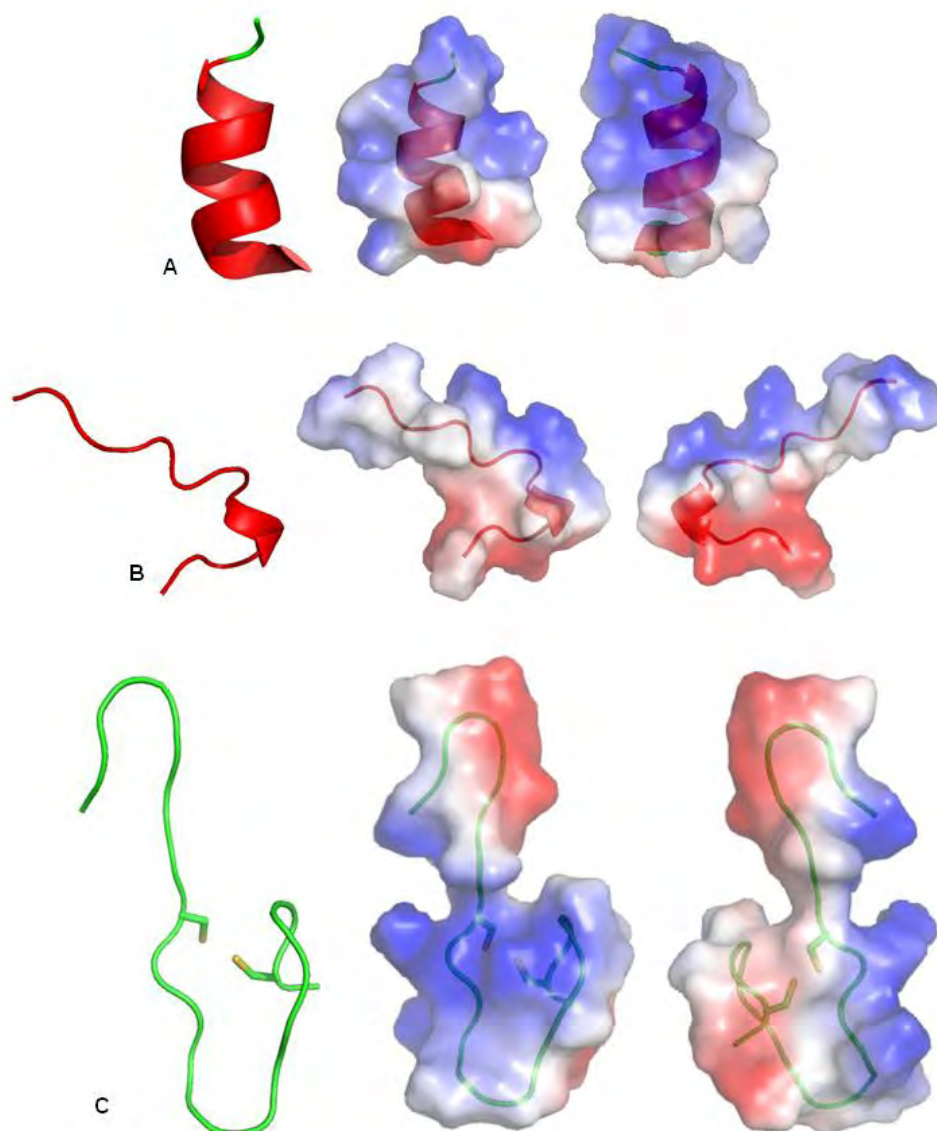


FIGURA 16: Imagens geradas pelo programa PyMol da conformação estrutural em ribbon e na forma de densidade superficial de carga, dos peptídeos Agelaia MP-I (A), Agelaia MP-II (B) e Pallipina-I (C). Legenda: em branco, resíduos de carga neutra; em azul resíduos de cargas positivas; em vermelho, resíduos de carga negativa.

Avaliar a qualidade do modelo é um quesito fundamental, uma vez que ela será proporcional à qualidade da estrutura tridimensional utilizada como molde (Sanchez et al 1998), sendo necessário avaliar o modelo por região e também como um todo.

Diversas metodologias existem para a avaliação da qualidade de uma dada estrutura, seja ela determinada experimentalmente ou por modelagem por homologia. Após a escolha do melhor modelo, análises mais criteriosas e detalhadas foram efetuadas com a utilização do PROCHECK (Diagrama de Ramachandran e G-factor), a fim de verificar a qualidade do modelo construído.

Esse programa foi utilizado para analisar a geometria global dos modelos através do Diagrama de Ramachandran (que apresenta os ângulos de ligação phi (ϕ) e psi (ψ) da cadeia principal, referentes às ligações C α -N e C α -C) e o G-factor (verifica os ângulos de ligação e a geometria covalente da proteína toda).

Segundo Ramachandran (Ramachandran et al 1963), uma estrutura de boa qualidade deve ter 90% ou mais de seus resíduos nas regiões mais favoráveis (regiões em vermelho). As áreas em branco correspondem a regiões onde existem os choques estereoquímicos na proteína. Estas regiões não permitidas estereoquimicamente (regiões em branco) valem para todos os aminoácidos, exceto a glicina (Gly) que é a única que não tem cadeia lateral e pode adotar os ângulos de torção ϕ e ψ em todos os quadrantes do diagrama de Ramachandran. As áreas vermelhas correspondem à conformação onde não há nenhum choque estereoquímico, ou seja, são as regiões permitidas e onde se encontram as hélices α e folhas β . As áreas em amarelo escuro e claro mostram regiões limitantes, porém ainda ângulos permitidos ou generosamente permitidos, respectivamente.

Como o template usado apresentava diferentes porções em hélice α , e possuíam tamanhos reduzidos, isso pode ter facilitado a formação de hélice em cada modelo. Os resíduos do amino- e do carboxi-terminal não são considerados porque podem se localizar em qualquer região do diagrama.

No presente estudo, o diagrama de Ramachandran do peptídeo Agelaia MP-I (Figura 17A) demonstra que 9 resíduos de aminoácidos do modelo teórico estão localizados na região mais favorecida do gráfico (regiões em vermelho) e 3 resíduos estão localizados na região adicionalmente favorecida (regiões em amarelo escuro). Dentre os 2 resíduos que faltam para totalizar os 14 resíduos de aminoácidos que constituem a sequência do peptídeo Agelaia MP-I, 2 correspondem aos últimos resíduos da sequência os quais o Procheck não considera quando gera o Gráfico de Ramachandran.

O diagrama de Ramachandran do peptídeo Agelaia MP-II (Figura 17B), demonstra 10 resíduos de aminoácidos do modelo teórico estão localizados na região mais favorecida do gráfico (regiões em vermelho) e 1 resíduo está localizado na região adicionalmente favorecida (regiões em amarelo escuro). Dentre os 3 resíduos que faltam para totalizar os 14 resíduos de aminoácidos que constituem a sequência do peptídeo Agelaia MP-II, 1 corresponde ao resíduo de Gly que é considerado por ter liberdade de se localizar em qualquer região do diagrama de Ramachandran e 2 resíduos são os últimos da sequência os quais o Procheck não considera quando gera o gráfico de Ramachandran.

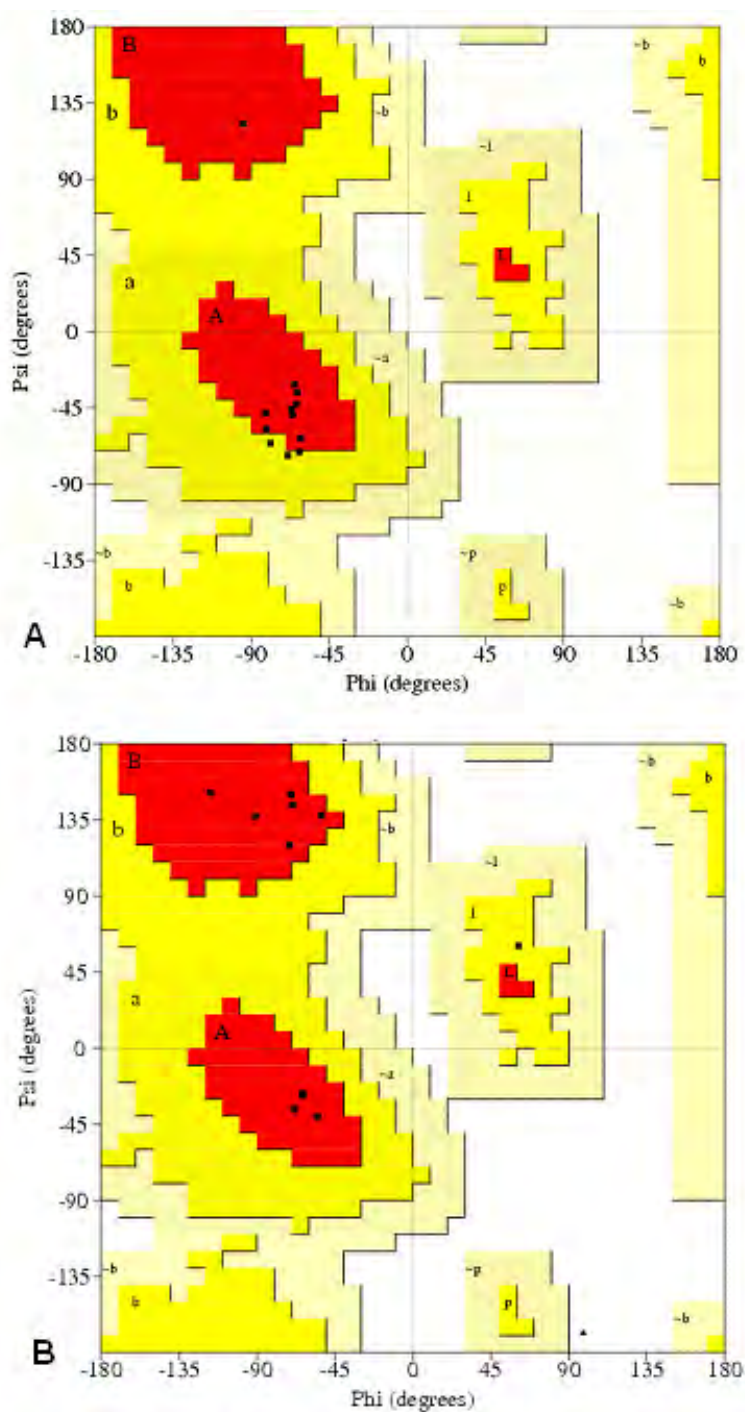


FIGURA 17: Diagrama de Ramachandran gerado pelo Procheck para o modelo para os peptídeos Agelaia MP-I (A), e Agelaia MP-II (B).

O diagrama de Ramachandran do peptídeo Pallipina-I (Figura 18) demonstra que 12 resíduos de aminoácidos do modelo teórico estão localizados na região mais favorecida do gráfico (regiões em vermelho), 2 resíduos estão localizados na região adicionalmente favorecida (regiões em amarelo escuro) e 1 resíduo está localizado na região não

favorecida do gráfico (regiões em branco). O resíduo que se encontra na região não favorecida, não causa choque estereoquímico, e está localizado nesta região por constituir uma estrutura randômica. Dentre os 5 resíduos que faltam para totalizar os 20 resíduos de aminoácidos que constituem a sequência do peptídeo Pallipina-I, 2 correspondem ao resíduo de Gly que é considerado por ter liberdade de se localizar em qualquer região do diagrama de Ramachandran, 2 resíduos de Pro e 1 resíduo que é o último da sequência o qual o Procheck não considera quando gera o Gráfico de Ramachandran.

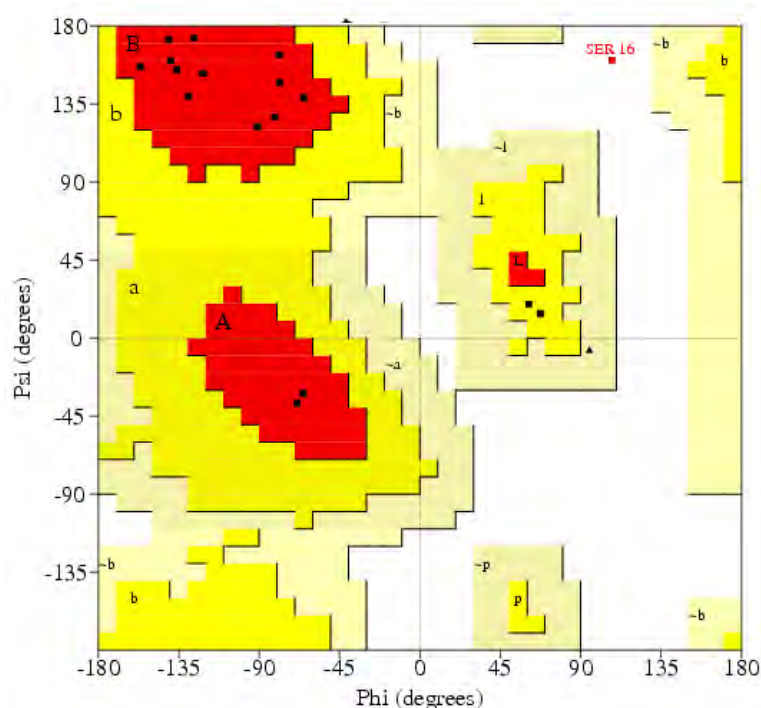


Figura 18: Diagrama de Ramachandran gerado pelo Procheck para o modelo para os peptídeos Pallipina-I.

A partir dos resultados obtidos nas três análises pode-se concluir que os modelos gerados possuem uma ótima qualidade estereoquímica, pois apresentam mais de 90% de seus resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran.

O G-factor global é uma medida da qualidade estereoquímica da estrutura como um todo sendo que o G-factor médio dos ângulos de torção e geometria covalente representa uma medida do desvio de uma dada propriedade estereoquímica para cada resíduo de aminoácido da estrutura. O valor ideal deste fator deve ser acima de -0.5. Valores no intervalo de -0.5 a -1.0 significam que existem resíduos no peptídeo que devem ser investigados e, valores abaixo de -1.0 indicam que os modelos apresentam qualidade estereoquímica ruim e devem ser investigados.

O G-factor global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula, pois representa a média de todos os G-factor obtidos para cada aminoácido da estrutura. As análises utilizando o programa PROCHECK (Diagrama de Ramachandran e G-factor), estão demonstradas na tabela 12.

TABELA 12: Análise da qualidade estereoquímica para os modelos dos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II.

Peptídeo	Região do Diagrama de Ramachandran				G-Factor		
	Mais Favorável (%)	Adicionalmente permitida (%)	Favoravelmente permitida (%)	Não permitida (%)	Ângulo de Torção	Geometria covalente	Média Total
Agelaia MP-I	100	0	0	0	0.62	0.01	0.37
Agelaia MP-II	100	0	0	0	0.52	- 0.09	0.26
Pallipina-I	80	13.3	0	6.7	0.10	-0.48	-0.12

Através dos resultados de análise do modelo estrutural tridimensional dos peptídeos do presente estudo (Tabela 12), podemos constatar que os modelos possuem uma ótima qualidade estereoquímica.

Para uma maior compreensão dos modelos gerados seria interessante a realização de uma simulação por dinâmica molecular em meio aquoso e em TFE, pois assim seria possível verificar o comportamento de cada um desses peptídeos nesses diferentes meios. Além disso, também seria possível verificar se ocorreria uma perda ou não da estrutura em hélice ao longo do tempo.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO OBTIDOS NAS ANÁLISES DO VENENO DA VESPA SOCIAL NEOTROPICAL *Agelaia vicina*

5.2.1 Fracionamento e Sequenciamento

A figura 19 mostra o cromatograma de fracionamento obtido a partir do veneno da vespa social *Agelaia vicina*.

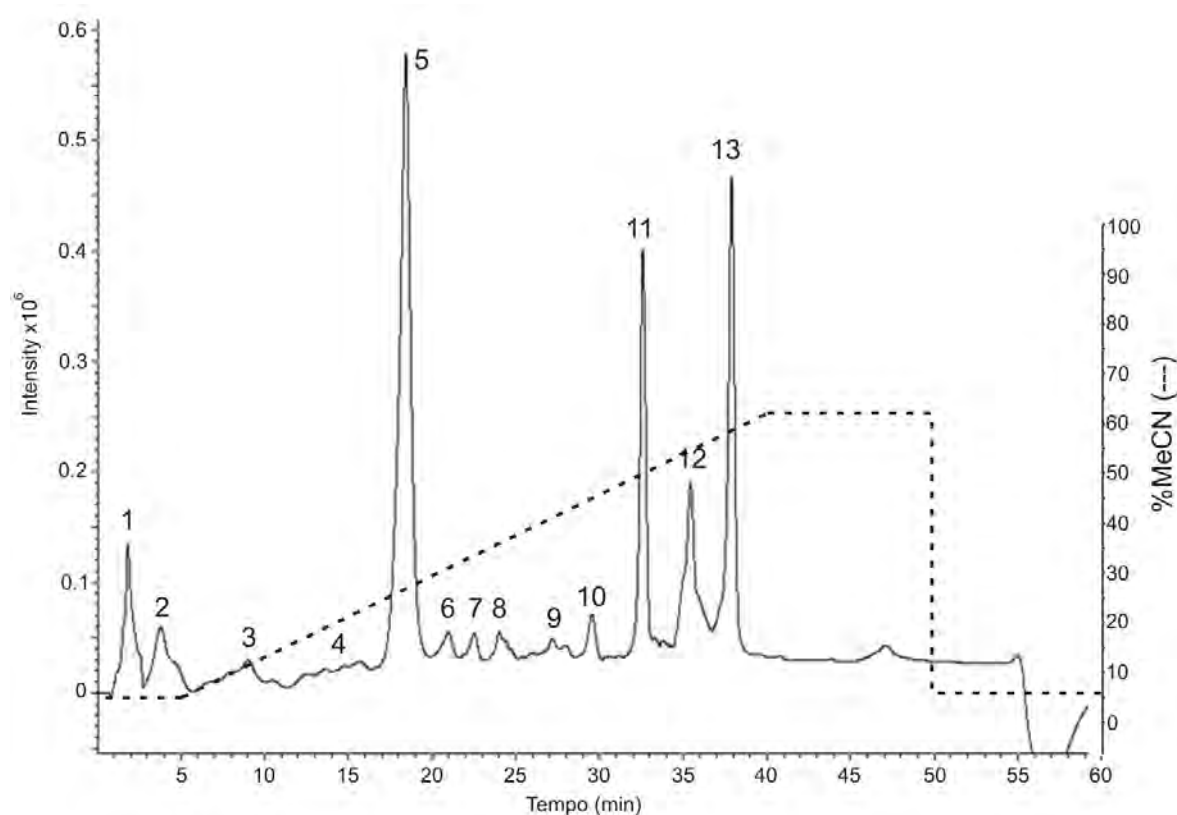


FIGURA 19: Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social *A. vicina* (TIC) RP-LCMS (SHIMADZU, Kyoto) utilizando-se de uma coluna WATERS Acquity UPLC® BEH130 C-18 (2,1 x 100mm, 3,5 µM), e um fluxo constante de solventes de 0,2 ml/min. A eluição foi realizada inicialmente em condições isocráticas de 0 a 5 minutos com 5% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA), seguida por um gradiente linear de 5 a 60% (v/v) MeCN (contendo 0,1% (v/v) TFA) no intervalo de tempo entre 5,1 a 42,0 min a 28 °C.

As frações de 1 a 6 correspondem a compostos de baixas massas moleculares (Saidemberg 2009) enquanto que as demais frações correspondem à compostos peptídicos.

Dentre os compostos peptídicos, as frações 8, 10, 12 e 13 correspondem, respectivamente, aos peptídeos Protonectina (7-12), Protonectina (1-6)-OH, Protonectina e *Agelaia* MP-I, anteriormente discutidos no veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*.

Portanto, para evitar repetições, nesta etapa de análises serão descritos apenas as frações 7, 11 e 12. Das três frações citadas apenas a fração 7 teve sua sequência primária determinada. As frações 11 e 12, devido as baixas concentrações e da pequena disponibilidade de veneno não tiveram suas estruturas primárias elucidadas, tendo sido apenas apresentado os espectros de MS¹ de cada uma delas (Figuras 21 e 22).

O espectro ESI-MS da fração 7 mostrado na figura 20A, revela o pico de m/z 302,20 como [M+H]⁺, enquanto que a figura 20B apresenta o espectro de MS² do íon molecular precursor de m/z 302,20, a partir do qual foi realizado o sequenciamento do peptídeo presente na fração 7. Nesta mesma figura também é possível verificar a presença da sequência dos íons da série b- de m/z 284,19 (b₃) e 171,11 (b₂).

A subtração dos valores de massa consecutivos dos íons da série b- permitiu o sequenciamento do peptídeo presente nessa fração, com algumas ambiguidade em relação aos resíduos isóbaros I/L: G-I/L-I/L. O íon da série d- de m/z 101,07 também aparece nesse espectro, caracterizando a presença de Leu na posição 2 da cadeia peptídica.

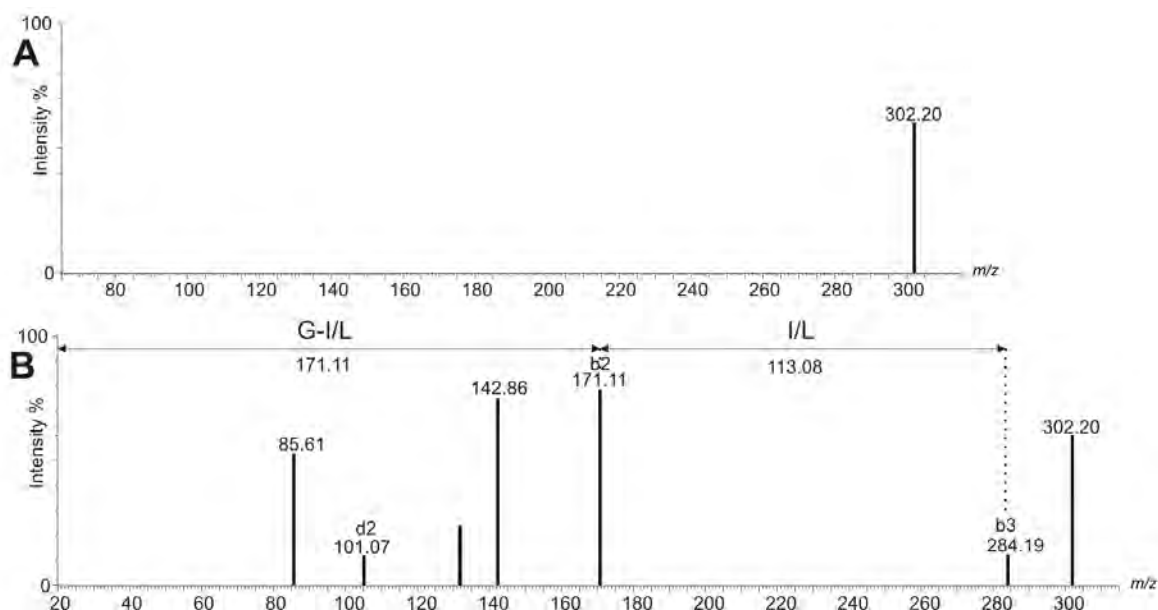


FIGURA 20: Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 7. Espectro ESI-MS/MS da fração 7 isolada do veneno bruto da vespa social *A. vicina*, com a respectiva interpretação do padrão de fragmentação em sequência de aminoácidos.

No entanto, ainda permaneceu a dúvida com relação à ambiguidade do resíduo I/L presente na posição C-terminal. Por isso, sintetizaram-se dois peptídeos, alternando-se os resíduos de I/L na posição C-terminal do peptídeo. Os tempos de retenção para cada peptídeo sintético e natural foram obtidos usando RP-HPLC (C18) (250 x 4,6mm, 5 μm)

com eluição isocrática em acetonitrila 29 % (v/v) (contendo 0,1 % de TFA), a um fluxo de 2 mL/min durante 25 min a 30°C (resultados não mostrados). O tempo de retenção de 19,4 minutos do peptídeo sintético com sequência G-L-L correspondeu ao mesmo tempo de retenção do peptídeo natural, indicando que o resíduo presente na posição C-terminal corresponde a Leu.

Finalmente, a massa molecular do peptídeo natural (302,20 Da) parece ser consistente com o resíduo C-terminal da forma ácida, dessa forma, a sequência completa final do peptídeo identificado na fração 7 é G-L-L-OH. Esse peptídeo foi denominado como Protonectina (7-9)-OH uma vez que ele corresponde aos resíduos de aminoácidos presentes nas posições 7-9 do peptídeo Protonectina (Dothsu et al 1993, Mendes et al 2004).

A figura 21 espectro ESI-MS da fração 11, revelou os picos de m/z 1216,38, 827,94, 608,70 e 487,16 correspondentes aos íons moleculares $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$ e $[M+5H]^{5+}$, respectivamente. Esses resultados indicam que a massa molecular desse peptídeo é de 2480,41 Da, sendo que esse valor poderia ter contribuição da presença de resíduos de Cys formadores de ligações dissulfeto. No entanto, devido a quantidades insuficientes dessa fração, não foi possível realizar análises mais aprofundadas.

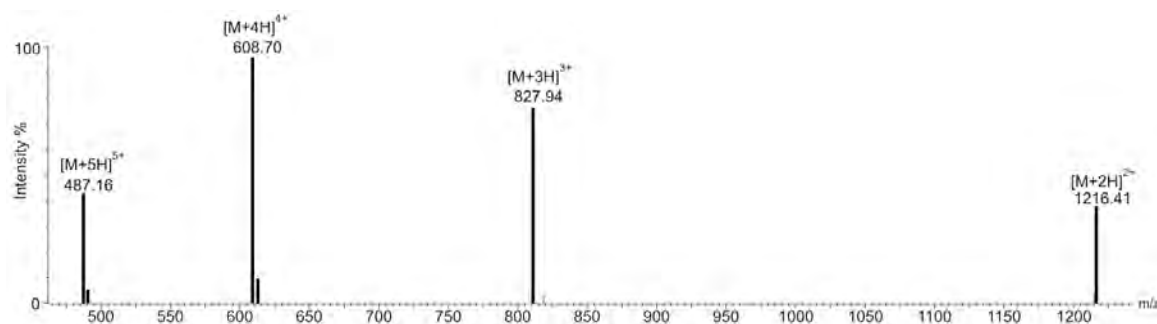


FIGURA 21: Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 11.

A figura 22 espectro ESI-MS da fração 12, revelou os picos de m/z 1209,83 e 605,42 correspondentes aos íons moleculares $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$, respectivamente. Além disso, é possível observar o íon de m/z 1231,83 que corresponde ao aducto de sódio do íon precursor na forma de $[M+Na]^+$. Esse peptídeo apresenta a mesma massa molecular do peptídeo Protonectina, previamente abordado na seção anterior deste trabalho.

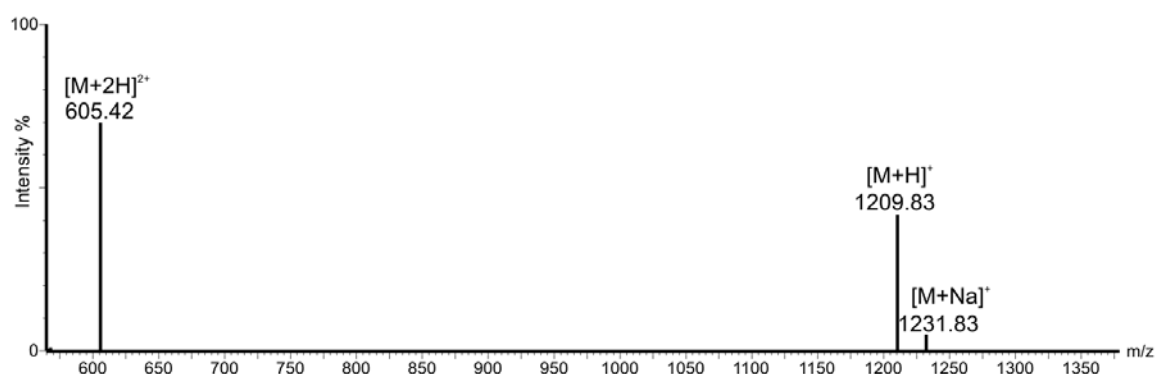


FIGURA 22: Espectros de massas do tipo ESI-MS fração 12.

A tabela 13 mostra as sequências dos peptídeos isolados e identificados no veneno da vespa social *A. vicina*:

TABELA 13: Sequências de aminoácidos de cada peptídeo purificado do veneno da vespa social *A. vicina*.

Frações	Sequência da Estrutura Primária	C-Terminal	m/z [M+H] ⁺	Massa teórica (Da)
7	G L L	OH	302,2	301,2
8	G L L K G L	NH ₂	599,5	598,4
10	I L G T I L	OH	629,3	628,3
12	I L G T I L G L L K G L	NH ₂	1209,8	1208,8
13	I N W K A I L Q R I K K M L	NH ₂	1566,9	1565,9

Comparando-se as massas teóricas da sequência de aminoácidos dos peptídeos, em relação às massas moleculares experimentais determinadas por espectrometria de massas para cada um dos peptídeos analisados, pôde-se verificar que as massas teóricas das sequências geradas por essa técnica foram idênticas às massas experimentais (Tabela 13), confirmando, dessa maneira, a exatidão das sequências de resíduos de aminoácidos obtidas.

A determinação da região C-terminal como sendo ácida ou amidada foi realizada através da comparação entre as massas teóricas das sequências dos peptídeos geradas em comparação com as massas experimentais determinadas por espectrometria de massas.

As diversas moléculas isoladas do veneno da vespa social *Agelaia vicina* são mostradas na figura abaixo (Figura 23), que mostra não só os componentes peptídicos identificados, mas também diversos compostos de baixas massas moleculares (Saidemberg 2009, Saidemberg et al 2010). O veneno dessa espécie de vespa social ainda deverá ter seu estudo aprofundado, pois apresentou compostos diferentes em relação ao veneno da vespa social *A. p. pallipes*.

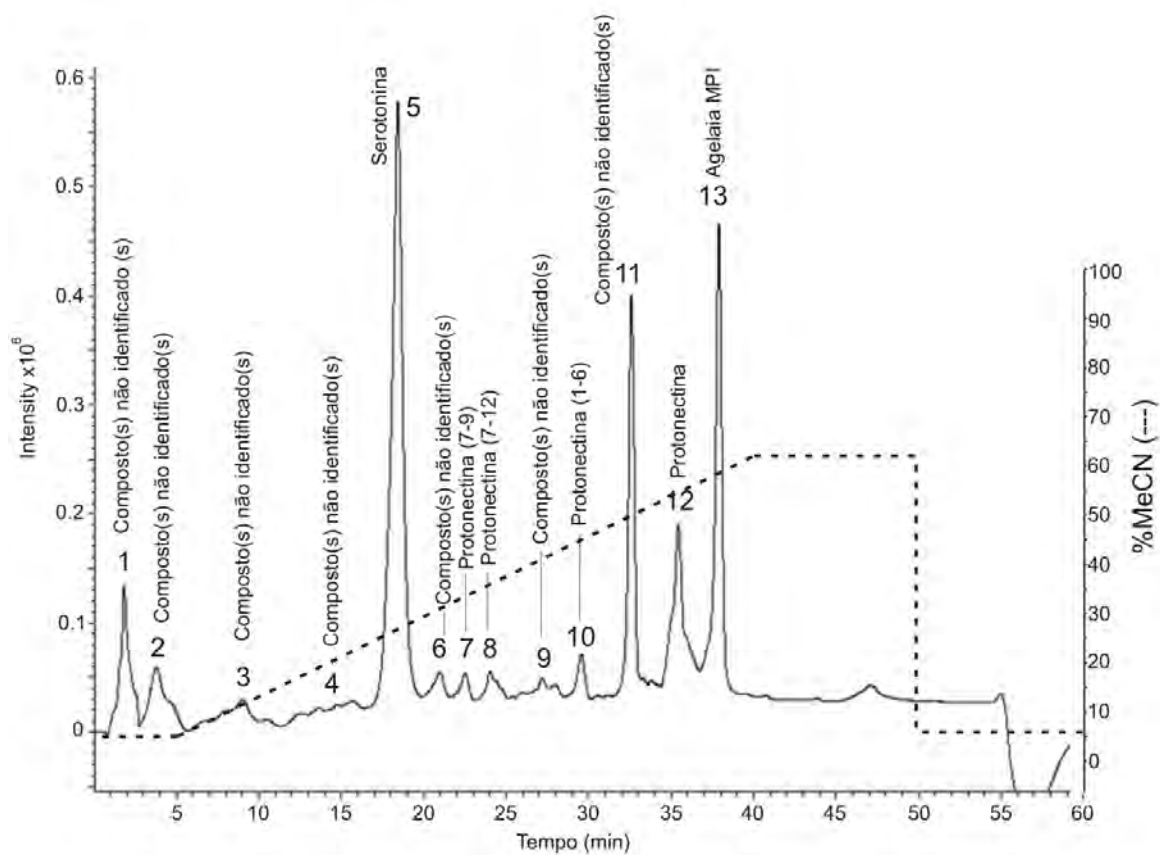


FIGURA 23: Perfil cromatográfico do fracionamento do veneno de *A. vicina*, mostrando as identificações obtidas.

**PARTE II: RESULTADOS DAS ANÁLISES FUNCIONAIS DOS
PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS**

5.3 RESULTADOS DE ATIVIDADES FUNCIONAIS

5.3.1 Atividade Hemolítica

Para estes ensaios foram testadas as concentrações de 1 ug/ul, 0,5 ug/ul, 0,25 ug/ul e 0,125 ug/ul (concentrações já bem estabelecidas pela literatura). Como controle foi utilizado a Melitina (peptídeo isolado do veneno de Apis, utilizado como controle de lise celular).

Por uma questão didática, os peptídeos foram separados em três grupos, levando em consideração as semelhanças entre suas estruturas primárias, para melhor visualização dos resultados:

- Grupo I: Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina (Figura 24);
- Grupo II: Agelaia MP-I, Agelaia MP-II (Figura 25);
- Grupo III: Pallipina-II e Pallipina-III (Figura 26).

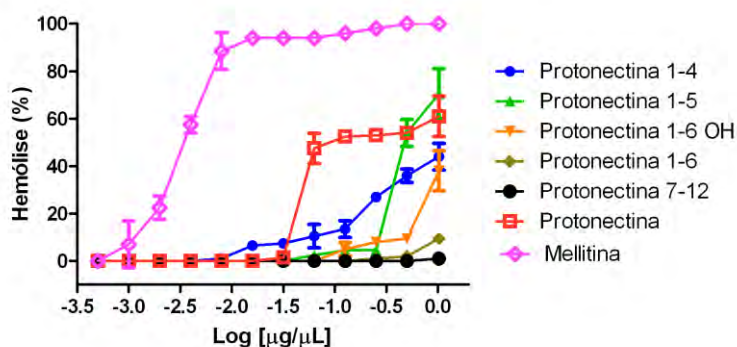


Figura 24: Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina incubados à 37° C.

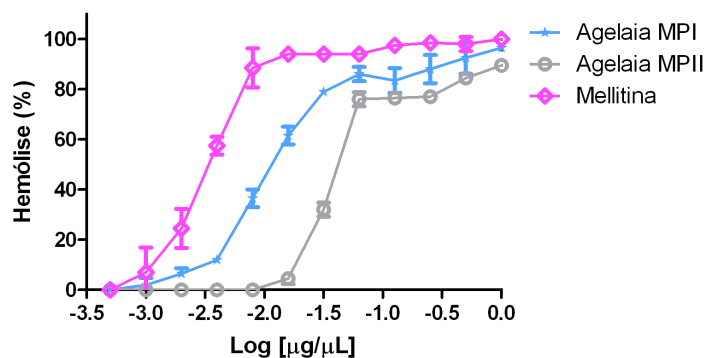


Figura 25: Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II, incubados à 37° C.

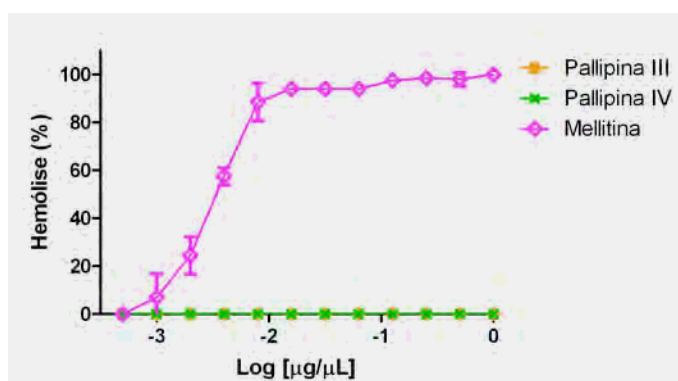


Figura 26: Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III, incubados à 37° C.

Estes resultados demonstraram que o peptídeo Protonectina (1-5) possui capacidade hemolítica, com um valor de $ED_{50} = 1,38 \mu\text{M}$; do peptídeo Protonectina é de $ED_{50} = 261 \mu\text{M}$, do peptídeo Agelaia MP-I é de $ED_{50} = 8 \mu\text{M}$ do peptídeo Agelaia MP-II é de $ED_{50} = 45 \mu\text{M}$ (controle Mellitina com $ED_{50} = 1,3 \mu\text{M}$). Já os peptídeos Protonectina (1-4), Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6) e Protonectina (7-12), apresentaram $ED_{50} > 2 \text{ mM}$ enquanto que os peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III não apresentaram nenhuma atividade hemolítica.

Esses resultados indicam que os peptídeos Protonectina (1-5)-OH, Protonectina, Agelaia MP-I e Agelaia MP-II apresentam-se líticos contra hemáceas, indicando que provavelmente estes compostos sejam capazes de interagir com fosfolipídios de membrana. Já os peptídeos Protonectina (1-4)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12), Pallipina-II e Pallipina-III não apresentam essa atividade.

5.3.2 Atividade Desgranuladora de Mastócitos Provenientes do Lavado Peritoneal de Ratos Wistar Machos

Para estes ensaios foram testadas as concentrações de 1 ug/ul, 0,5 ug/ul, 0,25 ug/ul e 0,125 ug/ul (concentrações já bem estabelecidas pela literatura). Manteve-se o mesmo agrupamento apresentado nos ensaios de Hemólise, e como controle foi utilizado a Melitina (peptídeo isolado do veneno de Apis, utilizado como controle de lise celular), uma vez que este peptídeo também é potente desgranulador de mastócitos.

- Grupo I: Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina (Figura 27);

- Grupo II: Agelaia MP I, Agelaia MP II (Figura 28);

- Grupo III: Pallipina-II e Pallipina-III (Figura 29).

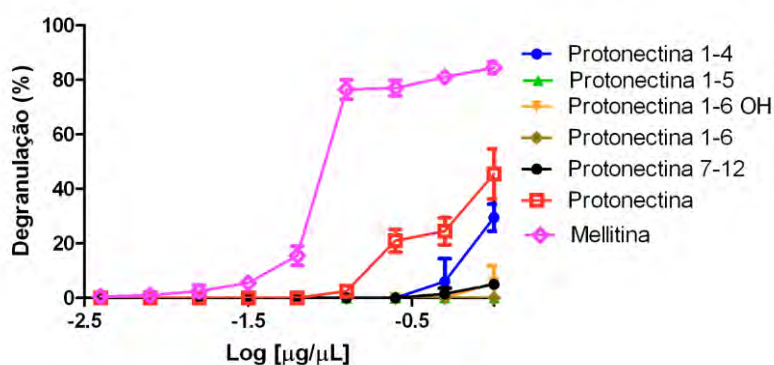


Figura 27: Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina.

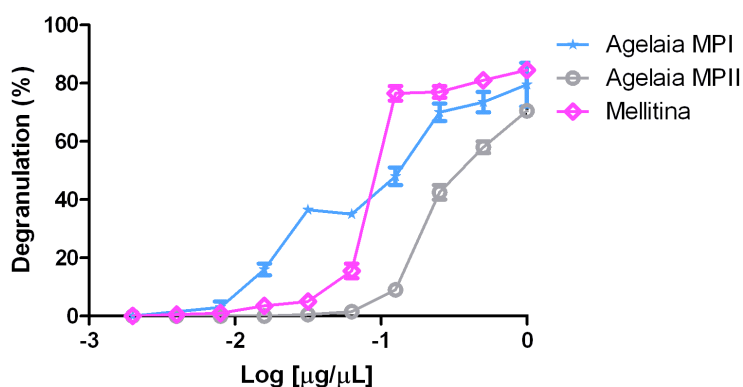


Figura 28: Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II.

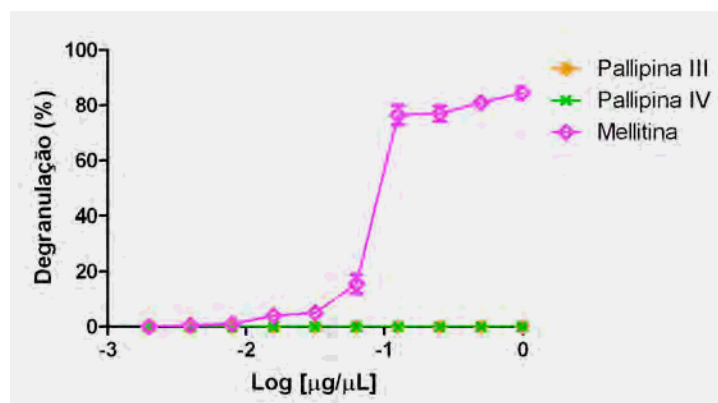


Figura 29: Ensaio de desgranulação de células provenientes do lavado peritoneal de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III.

Estes resultados demonstraram que o peptídeo Protonectina possui capacidade degranuladora com um valor de $ED_{50} = 827 \mu\text{M}$, do peptídeo Agelaia MP-I é de $ED_{50} = 87 \mu\text{M}$ do peptídeo Agelaia MP-II é de $ED_{50} = 263 \mu\text{M}$ (controle Mellitina com $ED_{50} = 57 \mu\text{M}$). Já os peptídeos Protonectina (1-4), Protonectina (1-5), Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6) e Protonectina (7-12), apresentaram $ED_{50} > 2 \text{ mM}$ enquanto que os peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III não apresentaram nenhuma atividade degranuladora.

Esses resultados indicam que os peptídeos Protonectina, Agelaia MP-I e Agelaia MP-II apresentam-se desgranuladores de mastócitos, indicando que provavelmente estes compostos sejam capazes de interagirem com fosfolipídios de membrana e/ou com receptores de membrana do tipo proteínas G. Já existem relatos na literatura confirmando que a interação dos peptídeos Protonectina e Agelaia MP-I ocorre pela interação dessas moléculas com receptores de proteínas G, desencadeando a desgranulação de mastócitos (Mendes et al 2004, Baptista Saidemberg et al 2010). Já os peptídeos Protonectina (1-4)-OH, Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12), Pallipina-II e Pallipina-III não apresentam essa atividade.

5.3.3 Atividade Quimiotática para Leucócitos Polimorfonucleares (PMNL's)

Para estes ensaios foram testadas as concentrações de 1 ug/ul, 0,5 ug/ul, 0,25 ug/ul e 0,125 ug/ul. A concentração total de células foi mantida em 10^5 células/mL. Manteve-se o mesmo agrupamento apresentado nos ensaios de Hemólise e Desgranulação.

Neste experimento, ensaiou-se também o controle negativo (sem toxina, somente

salina), que foi subtraído do valor dos grupos testados. Como controle, utilizou-se a Protonectina uma vez que esse peptídeo demonstrou potente atividade quimiotática para leucócitos polimorfonucleares.

- Grupo I: Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina (Figura 30);
- Grupo II: Agelaia MP-I, Agelaia MP-II (Figura 31);
- Grupo III: Pallipina-II e Pallipina-III (Figura 32).

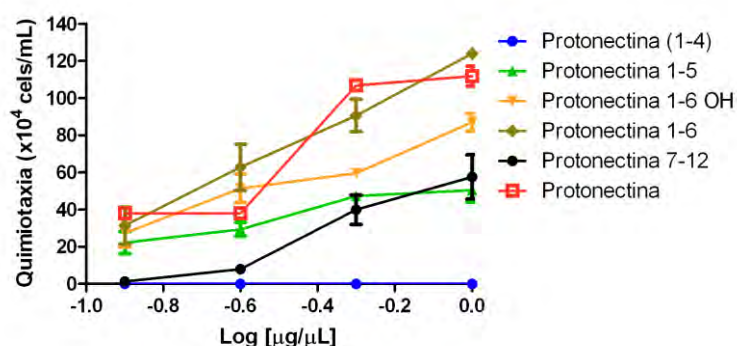


Figura 30: Ensaio de quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares isolados de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12) e Protonectina.

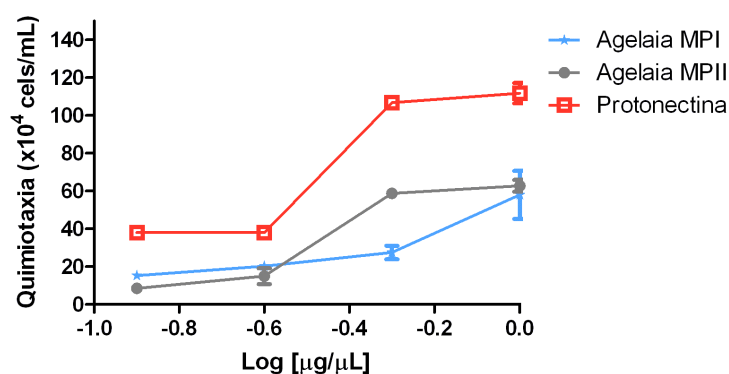


Figura 31: Ensaio de quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares isolados de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Agelaia MP-I e Agelaia MP-II.

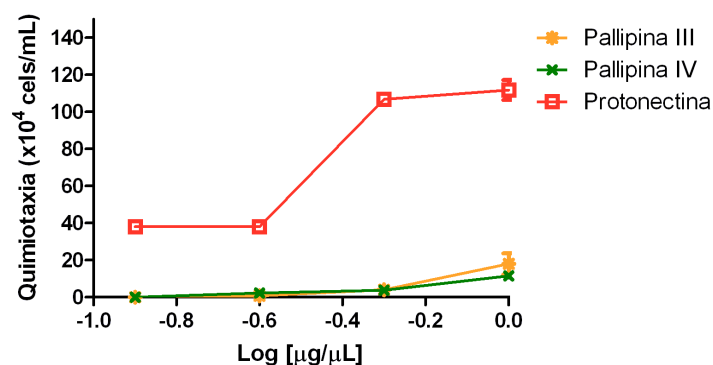


Figura 32: Ensaio de quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares isolados de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III

Esses resultados demonstram que os peptídeos Protonectina, Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Agelaia MP-I e Agelaia MP-II apresentam-se como quimioatraentes para leucócitos polimorfonucleares, indicando que provavelmente estes compostos sejam capazes de interagir com receptores de membrana do tipo proteínas-G responsáveis pela ativação da quimiotaxia. Já os peptídeos Protonectina (1-4)-OH, Protonectina (1-5)-OH, Protonectina (1-6)-OH, Protonectina (1-6), Protonectina (7-12), Pallipina-II e Pallipina-III não apresentam essa atividade.

A fim de facilitar a comparação entre os resultados das atividades biológicas obtidas, a tabela 14 resume as atividades biológicas encontradas para cada um desses peptídeos.

TABELA 14: Comparação entre as dose efeito dos peptídeos testados.

PEPTÍDEO	SEQUENCIAS	N-TERMINAL	ED ₅₀ DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	
			HEMÓLISE	DESGRANULAÇÃO
Protonectina (1-4)	ILGT	OH	> 2 mM	> 2 mM
Protonectina (1-5)	ILGTI	OH	1,38 μM	> 2 mM
Protonectina (1-6)-OH	ILGTIL	OH	> 2 mM	> 2 mM
Protonectina (1-6)	ILGTIL	NH ₂	> 2 mM	> 2 mM
Protonectina (7-12)	GLLKGL	NH ₂	> 2 mM	> 2 mM
Protonectina	ILGTILGLLKGL	NH ₂	261 μM	827 μM
Agelaia MP-I	INWKAILQRIKKML	NH ₂	8 μM	87 μM
Agelaia MP-II	INWLKLGKAIIDAL	NH ₂	45 μM	263 μM
Pallipina-I	GIIDDQQCKKKPGQSSPVC	OH	Não significativa	Não significativa
Pallipina-II	SIKHKICKLLERTLKLTPFC	NH ₂	Não significativa	Não significativa
Pallipina-III	SIKHKICIALLRGGSKLPFC	NH ₂	Não significativa	Não significativa

5.3.4 Resultados dos Ensaio de Dor e Inflamação

Diversas moléculas isoladas das secreções dos insetos, assim como de muitos outros artrópodes, apresentam propriedades de importância terapêutica tais como, atividade antibiótica, efeito antinociceptivo, antiinflamatório, anticonvulsivante e baixa imunogenicidade (Konno et al 2007, Konno et al 2006, dos Santos Cabrera et al 2004, Mendes et al 2004a,b, Konno et al 2001, Palma et al 1997a,b, Mortari et al 2005, Mendes e Palma 2007).

Os venenos de Hymenoptera são responsáveis por 9,3 a 28,5% de processos de sensibilização no mundo inteiro (Antonicelli et al 2002). Estas ferroadas promovem dor severa, inflamação local, sensibilização, alterações locais e sistêmicas e ocasionalmente morte em pacientes alérgicos (Antonicelli et al 2002, Steen et al 2005).

O processo inflamatório e doloroso, decorrente da ferroada desses insetos deve-se, pelo menos em parte, da ação desses peptídeos alterando a permeabilidade vascular e à sua ação ativando neurônios nociceptivos (Griesbacher et al 1998). Baseado nos dados citados anteriormente e na escassez de bibliografia relacionada à atividade antinociceptiva/nociceptiva de substâncias isoladas de insetos neotropicais, foram iniciados, por nosso grupo, estes estudos.

Dessa forma, avaliou-se a possível dor e inflamação ocasionada pela injeção, por via intraplantar (i.pl.), em camundongos Swiss, dos peptídeos Protonectina, Protonectina (1-5) e Protonectina (1-6), cada um deles nas doses de 10, 30 e 50 µg/50 µL (Figuras 34, 35, 36). O controle positivo utilizado foi a carragenina (Cg, i.pl., 300 µg/50 µL). Nos animais controle foi administrado o mesmo volume de salina (S) nas mesmas condições experimentais.

Os resultados mostrados na figura 33 indicaram significativo aumento na intensidade de hipernocicepção com pico após a segunda hora da administração da Protonectina (10, 30 e 50 µg/50 µL) ou da carragenina (Figura 33), caracterizando o fenômeno de hipernocicepção (hiperalgesia). Cabe ressaltar que as medidas realizadas anteriormente ao período da segunda hora não causou hipernocicepção nos animais (dados não mostrados). Além disso, não foi observado nocicepção na oitava hora do período experimental. Também não houve diferença no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (S, controle, Figura 33A).

No que concerne ao efeito edematogênico, os resultados mostraram que após a segunda hora do tratamento, tanto a Protonectina (10, 30 e 50 µg/50 µL) quanto a

carragenina promoveram aumento significativo do volume da pata dos animais (edema), quando comparado aos camundongos tratados com salina (S, controle, Figura 33B). Esse efeito foi observado até a quarta hora de experimentação. Além disso, é importante ressaltar que, nestas mesmas condições experimentais, a salina não interferiu com o volume da pata dos animais durante todo o período de observação (Figura 33B).

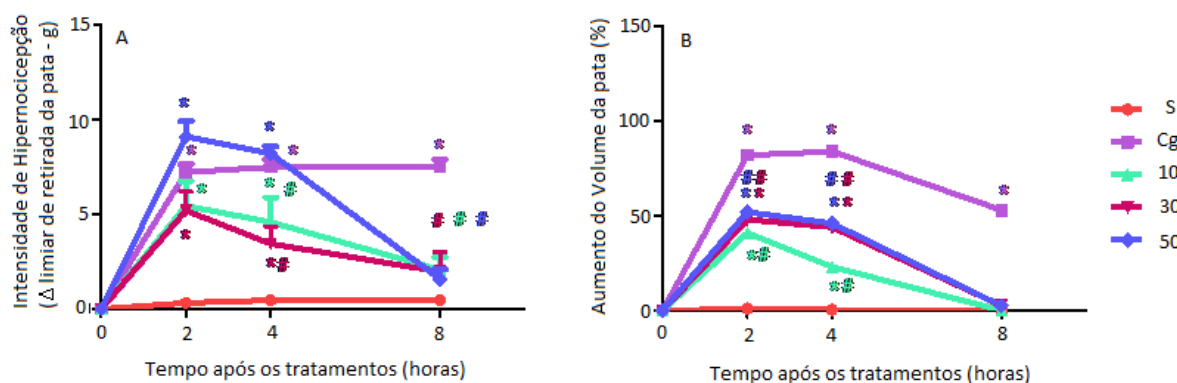


FIGURA 33: Efeito do peptídeo Protonectina sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B, C). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 2, 4 e 8 horas após a administração do peptídeo protonectina (10, 30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo Salina (S); # $p < 0,001$ em relação ao grupo Carragenina (Cg).

Os resultados mostrados na figura 34 indicaram significativo aumento na intensidade de hipernociceção com pico após a quarta hora da administração da Protonectina (1-5) (10, 30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou da carragenina (Figura 34A), caracterizando o fenômeno de hipernociceção (hiperalgesia). Cabe ressaltar que as medidas realizadas anteriormente ao período da quarta hora não causou hipernociceção (dados não mostrados). Por outro lado, não foi observado nociceção na oitava hora do período experimental. Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (S, controle, Figura 34A).

No que concerne ao efeito edematogênico Protonectina (1-5) (30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), os resultados mostraram que após a segunda hora do tratamento, a Protonectina (1-5) ou carragenina acarretaram aumento significativo do volume da pata dos animais (edema), quando comparado aos camundongos tratados, com salina (S, controle, Figura 34B). O efeito edematogênico da Protonectina (1-5) (30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) foi observado até a quarta hora de experimentação. A salina, nestas mesmas condições experimentais, não interferiu com o volume da pata dos animais durante todo o período de observação (Figura 34B).

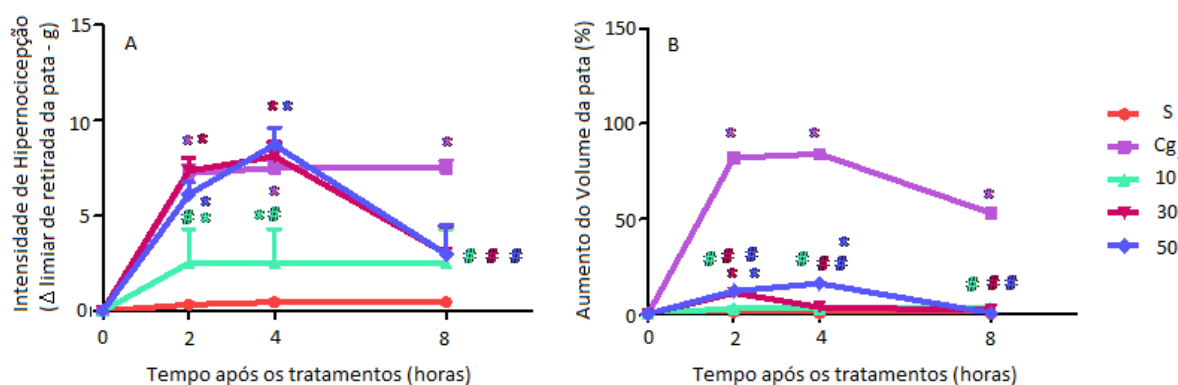


FIGURA 34: Efeito do peptídeo Protonectina (1-5) sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B, C). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 2, 4 e 8 horas após a administração do peptídeo protonectina (1-5) (10, 30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo Salina (S); # $p < 0,001$ em relação ao grupo Carragenina (Cg).

Os resultados mostrados na figura 35 indicaram significativo aumento na intensidade de hipernociceção com pico após a segunda hora da administração da Protonectina (1-6) (30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou da carragenina (Figura 36A), caracterizando o fenômeno de hipernociceção (hiperalgesia). Cabe ressaltar que as medidas realizadas anteriormente ao período da segunda hora não causou hipernociceção (dados não mostrados). Por outro lado, não foi observado nociceção na oitava hora do período experimental (dados não mostrados). Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (S, controle, Figura 35A).

No que concerne ao efeito edematogênico da Protonectina (1-6) (30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), os resultados mostraram que após a segunda hora do tratamento, a Protonectina (1-6) ou carragenina acarretaram aumento significativo do volume da pata dos animais (edema), quando comparado aos camundongos tratados, com salina (S, controle, Figura 35B). Por outro lado, a salina nestas mesmas condições experimentais, não interferiu com o volume da pata dos animais durante todo o período de observação (Figura 35B).

Os venenos de vespas sociais possuem tetra-, penta-, hexa- ou hepta peptídeos, porém poucos até o momento foram sistematicamente caracterizados. Entre as ações observadas para estes pequenos peptídeos incluem atividade antimicrobica, proteolítica e quimiotática (Monoi et al., 2004; Xu et al., 2006).

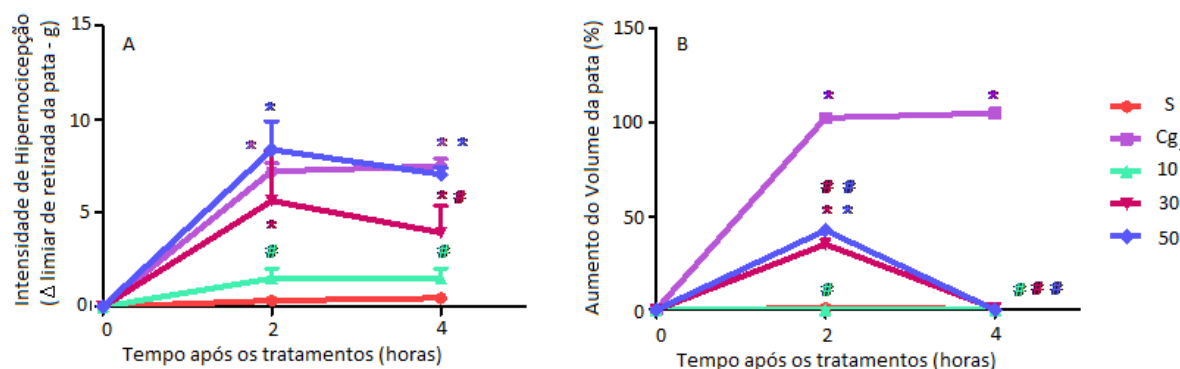


FIGURA 35: Efeito do peptídeo Protonectina (1-6) sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B, C). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 2 e 4 horas após a administração do peptídeo protonectina (1-6) (10, 30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo Salina (S); # $p < 0,001$ em relação ao grupo Carragenina (Cg).

Além disso, esses resultados demonstraram que a Protonectina, Protonectina (1-6) e Protonectina (1-5) apresentaram potente efeito hiperalgésico e edematogênico sendo, dessa forma, interessante aprofundar o possível envolvimento de mediadores envolvidos na via da cicloxigenase e da lipoxigenase, bem como o envolvimento de receptores do tipo H_1 , H_2 e H_3 nos efeitos nociceptivos observados por estes peptídeos.

É importante salientar que esses resultados mostraram que não existe uma relação direta entre o desenvolvimento de hiperalgesia e edema nos peptídeos testados.

O processo inflamatório é frequentemente associado com dor e hiperalgesia (Levine et al 1993, Ferreira and Lorenzetti 1995). A hiperalgesia pode ser definida como uma manifestação patofisiológica resultante da sensibilização dos nociceptores e é um evento fundamental no desenvolvimento da dor inflamatória (Ferreira, 1980). A hipersensibilidade da dor inflamatória é consequência de alterações na transdução dos sinais nos terminais periféricos (nociceptores) de alto limiar de ativação e na excitabilidade no sistema nervoso central.

Alterações na sensibilidade do processo de transdução são moduladas por alterações na membrana dos canais iônicos de uma maneira dependente de fosforilações (England et al 1996, Gold et al 1996). Tais alterações são secundárias à ativação dos nociceptores pelos mediadores inflamatórios (Treede and Cole 1993; Reeh 1994; Dray 1995, Ferreira and Lorenzetti 1995). Estes mediadores incluem histamine, bradicinina, citocinas, fator de crescimento de nervo, eicosanóides e mediadores simpáticos que atuam em conjunto de maneira sinérgica (Dray 1995, 1997).

Estudos realizados por Chen e colaboradores (2008) mostraram o papel diferente das proteínas quinases A e C em modelos de hiperalgesia térmica e mecânica, bem como no processo inflamatório observado no veneno bruto de abelha. Estes resultados indicaram que mecanismos distintos estão envolvidos no desenvolvimento de hiperalgesia e edema induzido pelo veneno.

Ainda, os resultados encontrados por Zanchet e colaboradores (2003) mostraram esta mesma divergência entre o desenvolvimento de hiperalgesia e edema induzido pelo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. O veneno da aranha *P. nigriventer* contém histamina e serotonina (Schenberg and Pereira-lima, 1971), os quais poderiam interferir com neuroatividades sensoriais e, portanto poderiam contribuir para o efeito algogênico do veneno. Porém, o envolvimento de outros mediadores inflamatórios, incluindo aminas biogênicas na gênese da hiperalgesia e do efeito edematogênico não foi descartado, o que poderia explicar o fato do processo hiperalgésico não estar diretamente relacionado com o edematogênico.

Chacur e colaboradores (2001) concluíram que mecanismos distintos também estão envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia e edema induzida pelo veneno de *Bothrops asper*, onde a hiperalgesia é mais rapidamente controlada por drogas dotadas de atividade antiinflamatória.

O peptídeo Palipina –III, diferentemente dos peptídeos anteriormente descritos não causou hipernocicepção nem efeito edematogênico em nenhuma das doses testadas (10, 30 e 50 µg/50 µL) (Figura 36). Por outro lado, foi observado nocicepção da carragenina (controle positivo) durante todo o período experimental. Também não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (S, controle).

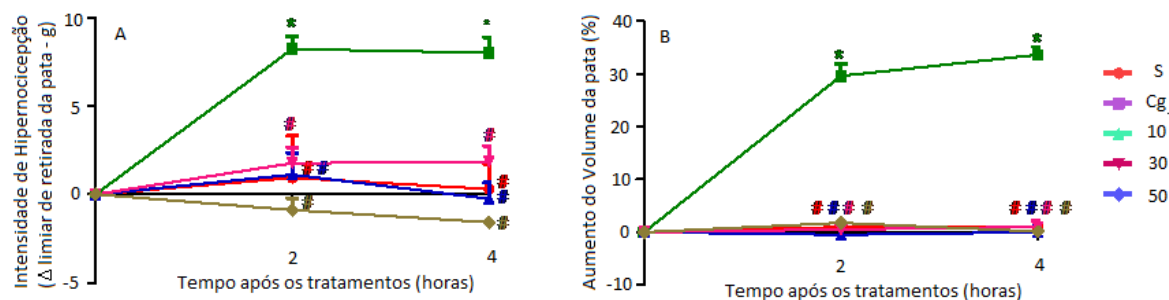


Figura 36: Efeito do peptídeo Palipina sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 2 e 4 horas após a administração do peptídeo palipina (10, 30 e 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo Salina (S); # $p < 0,001$ em relação ao grupo Carragenina (Cg).

Uma vez que o peptídeo Pallipina –III apresentou resultado negativo tanto para hipernociceção quanto edema, avaliou-se a possibilidade dessa molécula apresentar efeito analgésico (Figura 37). Para tanto, foi utilizado o estímulo algogênico (carragenina), onde a Pallipina-III reverteu o efeito nociceptivo da carragenina, bem como bloqueou o edema induzido pela carragenina (Figura 37A e 37 B).

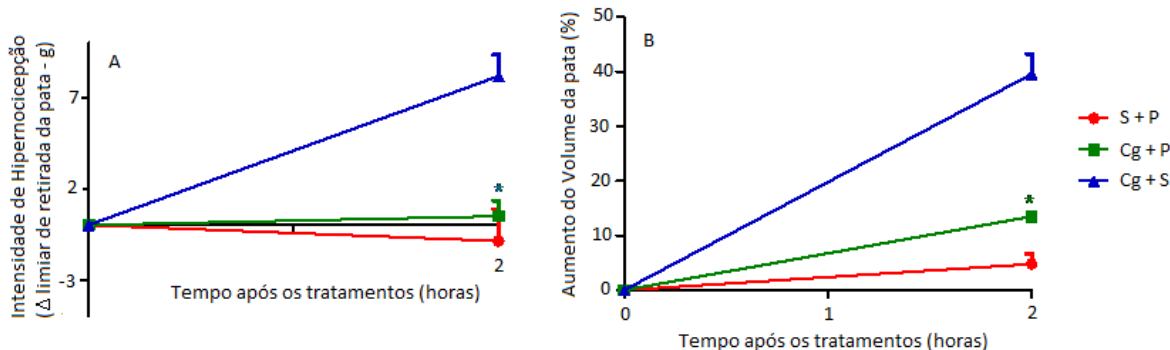


FIGURA 37: Efeito do peptídeo Palipina sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento da pata (edema) sobre o efeito algogênico da carragenina. O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 1 e 2 horas após a administração do peptídeo palipina (50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo Carragenina + Salina (Cg+S).

5.3.5 Ensaios de Secreção de Insulina

A insulina é o principal regulador hormonal do metabolismo da glicose, primeiramente isolado por Banting e Best em 1921, em tecido pancreático. Nos mamíferos, a expressão do gene da biossíntese da insulina se restringem as células beta no pâncreas

endócrino (Orci 1985, Muglia e Locker 1984, Giddings e Carnaghi 1990).

No entanto, ceto-ácidos (Um et al 2004), ácidos graxos (Li et al 2004), amino ácidos (Stoppigli et al 2002, Gao et al 2003, Garcia et al 2007, Ribeiro et al 2009, Carneiro et al 2009, Ribeiro et al 2010, Amaral et al 2010), neurotransmissores (Gilon e Henquin 2001, Gautam et al 2007), hormônios peptídicos (Nesher et al 2002, Mecclenaghan 2007, Hiriat e Aguiar-Bryan 2008) e toxinas peptídicas isoladas de venenos ou produtos das secreções exócrinas de animais (Swope e Shonbrunn 1984, Swope e Shonbrunn 1987, Komatsu et al 1993, Kowluru et al 1995, Eddlestone et al 1995, Marangoni et al 1995, Straub et al 1998, Swope e Shonbrunn 1998, Carneiro et al 2000, Ohara-Imaizumi et al 2001, Corsi 2001, Daniel et al 2002, Kowluru 2002, Amin et al 2003, Gonçalves et al 2003, Marenah et al 2004), também foram descritos como capazes de regular a função das células β pancreáticas.

Uma vez que nos venenos das vespas sociais estudadas nesse trabalho identificaram-se moléculas cujas estruturas assemelham-se tanto ao do peptídeo Mastoparano como também do peptídeo Silverina, ensaiaram-se os peptídeos Agelaia MP-I, Pallipina-I (cadeia aberta), Pallipina-II e Pallipina-III, para determinar a possível atividade modulatória da secreção de insulina em células beta isoladas de camundongos Swiss.

A figura 38 mostra o comportamento das ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos após estímulo com o peptídeo Agelaia MP-I. Neste experimento observou-se que houve estimulação da secreção de insulina de forma dose-dependente tanto nas ilhotas controle quanto do grupo de ilhotas que foram incubadas com Agelaia MP-I. O peptídeo Agelaia MP-I estimulou a secreção nas concentrações de 2.8 mM e de 11.1 mM de glicose, quando comparados às ilhotas controle ($P < 0,05$). Contudo, não se observou alterações na secreção frente à 22.2 mM de glicose entre os grupos estudados, sugerindo que esse efeito esteja relacionado a algum metabólito ou mensageiro formado a partir do metabolismo da glicose que possa interagir com os efeitos do peptídeo Agelaia MP-I.

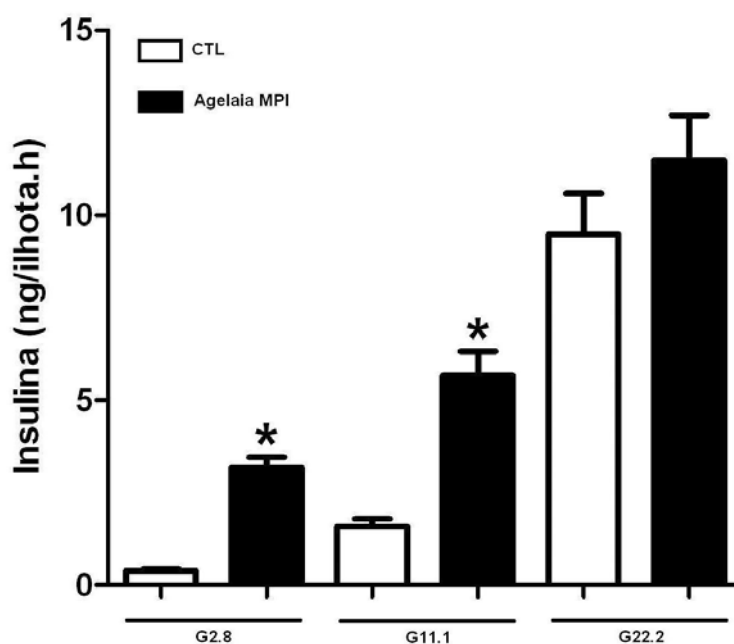


FIGURA 38: Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 10 μ M do peptídeo Agelaia MP-I. Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL.

Mesmo com a adição das drogas supracitadas, o peptídeo Agelaia MP-I promoveu maior secreção de insulina frente à 2,8 e 11,1 mM de glicose comparado ao grupo CTL (P < 0,05). Ilhotas incubadas com Agelaia MP-I persistentemente secretaram mais insulina frente à 2,8 mM de glicose, mesmo com a adição de DZX e/ou NIF ao meio de incubação. Apesar de DZX e NIF reduzirem a secreção no grupo Agelaia MP-I, a secreção de insulina neste grupo ainda permaneceu elevada em relação ao CTL na presença destes inibidores (P < 0,05) (Figura 39).

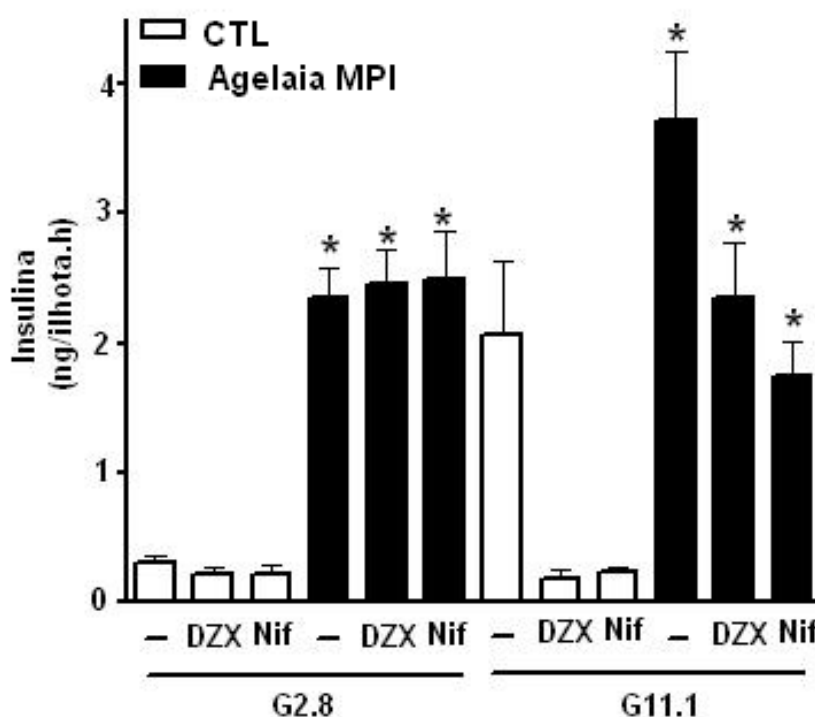


Figura 39: Secreção estática de insulina frente à glicose 2,8 (G2.8) e 11,1 mM (G11.1) na presença de Agelaia MP-I 8 μ M, ou em sua ausência. Dados representam a média \pm EPM n = 8. *P < 0,05 vs CTL na mesma condição.

Estes dados sugerem que os efeitos do peptídeo Agelaia MP-I sobre a secreção de insulina ocorre de maneira independente da atividade dos canais de K^+ dependente de ATP e Ca^{2+} sensível à voltagem. É necessário ressaltar que as ações da Agelaia MP-I sobre a atividade secretória das ilhotas pancreáticas não se deve à lesões ou extravasamento celulares, uma vez que as ilhotas utilizadas nos experimentos de secreção reincubadas com glicose (11,1 ou 22,2 mM) na ausência de Agelaia MP-I apresentaram secreção similar ao grupo CTL (resultados não mostrados).

As ações dos peptídeos: Pallipina-I (cadeia aberta), Pallipina-II e Pallipina-III sobre a secreção de insulina também foram testados e os resultados obtidos são mostrados nas figuras 40, 41 e 42, respectivamente.

O peptídeo Pallipina-I (cadeia aberta) não alterou a secreção das ilhotas testadas em nenhuma das três condições de glicose testadas (2.8, 11.1 e 22.2 mM). Na presença de glicose 11.1 mM tanto o peptídeo Pallipina-II, como o peptídeo Pallipina-III, inibiram significativamente a secreção de insulina das ilhotas testadas. O peptídeo Pallipina-III é similar ao peptídeo Silverina (Dohtsu et al 1993) no que diz respeito à sequência de aminoácidos (Baptista-Saidemberg 2010). Ambos causaram a inibição da secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Corsi 2001).

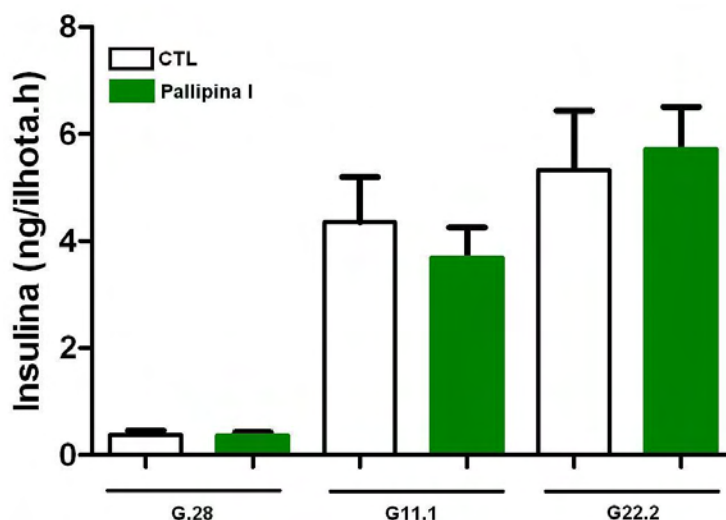


FIGURA 41: Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 1 μ M do peptídeo Pallipina-I (cadeia aberta). Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL.

O peptídeo Pallipina-I (cadeia aberta) não alterou a secreção das ilhotas testadas em nenhuma das três condições de glicose testadas (2.8, 11.1 e 22.2 Mm) (Figura 40), enquanto que os peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III, inibiram significativamente a secreção de insulina das ilhotas testadas na concentração de 11.1 mM de glicose (Figuras 41 e 42, respectivamente). Ambos peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III são similares ao peptídeo Silverina (Dohtsu et al 1993) no que diz respeito à sequência primária de aminoácidos), peptídeo este que, segundo Corsi (2001), também promoveu a inibição da secreção de insulina pelas células β pancreáticas, através da redução da captação de Ca^{2+} por essas células. Desta forma, como a sequência de aminoácidos do peptídeo Pallipina-II e Pallipina-III são similares ao da Silverina (Dohtsu et al 1993), sugere-se que ambos peptídeos também altere o fluxo do íon Ca^{2+} em ilhotas isoladas.

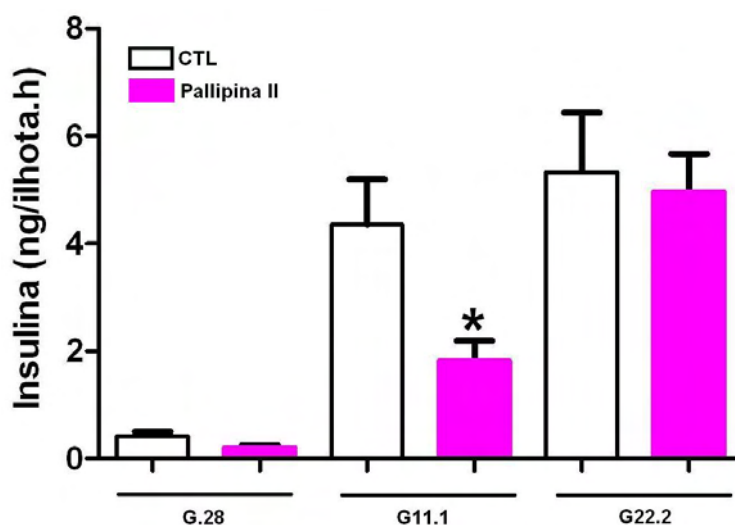


FIGURA 41: Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 1 μ M do peptídeo Pallipina-II. Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL.

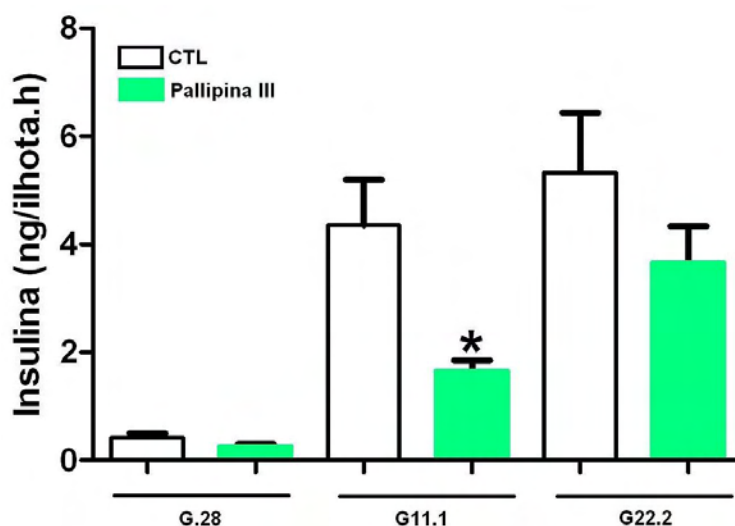


FIGURA 42: Secreção estática de insulina em resposta à concentrações crescentes de glicose na presença ou ausência de 1 μ M do peptídeo Pallipina-III. Dados representam a média \pm EPM, n = 8. *P < 0,05 vs CTL.

A compreensão sobre o modo de ação dos venenos dos Hymenoptera sociais exige que se reflita sobre o uso do ferrão e dos venenos destes insetos, como parte de suas estratégias defensivas. Um fato evolutivamente importante nos Hymenoptera sociais foi o aparecimento do ferrão, uma vez que este apêndice proporcionou maior sucesso relacionado à defesa contra outros animais, através do qual os diferentes compostos presentes em seus venenos são inoculados, causando diversas reações importantes, de dor local até processos imunológicos importantes (Castro e Palma 2009).

Apesar do comportamento defensivo dos Hymenopteras variar entre as espécies,

pode-se dizer que o envenenamento causado por esses animais tem como intuito repelir ou afastar outros animais que possam ameaçar seus ninhos. Dessa forma, é importante ter em mente que o efeito principal do veneno não é provocar a morte do animal “intruso” dentro dos limites de segurança das colônias, mas sim, causar uma sensação de desconforto nas vítimas de ferroadas, através do efeito mneumônico (Schimidt 1990, Manzolli-Palma e Palma 1992, Castro e Palma 2009).

A fim de relacionar as atividades funcionais descritas anteriormente com os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos isolados neste trabalho, foi proposto um mecanismo geral de envenenamento para as toxinas peptídicas dos venenos das vespas do gênero *Agelaia*, baseados nos resultados do presente trabalho (Figura 43).

Os compostos de natureza peptídica (que compõe até 70% do conteúdo total desses venenos) presentes no veneno desses animais são policatiônicos, apresentam estrutura secundária anfifílica sendo estruturalmente desorganizados em meio aquoso, e estruturas helicoidais (geralmente ricas em hélice α) em ambientes hidrofóbicos (Nakajima et al 1995, Katsu et al 1990, Vold et al 1997, Mendes et al 2004). Neste último caso, favorecendo a interação dessas moléculas com membranas celulares, perturbando a organização dos fosfolídeos, podendo até promover a desestruturação destas membranas. Esses peptídeos podem ainda interagir com receptores protéicos e canais iônicos presentes nas membranas celulares (Piek et al 1990, Holz et al 2000, Monoi et al 2004, Belebni et al 2004).

Os compostos peptídicos dos venenos desses animais podem agir isoladamente ou em conjunto (Baptista-Saidemberg et al 2010), os peptídeos da classe dos mastoparanos promovem a desgranulação de mastocitos (Hirai et al 1978). Uma vez liberados, esses grânulos, além de causar inflamação no local da ferroadada, desencadeiam uma cascata de eventos como, por exemplo, a vasodilatação de capilares (que também ocorre devido à presença de cininas nesses venenos), promovendo a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares para o local da ferroadada (Pisano 1968, Toki et al 1988). Além disso, a presença desses compostos “estranhos” ao organismo interagem com receptores de membrana, desencadeando dor no local da ferroadada (Pisano 1968, Toki et al 1988).

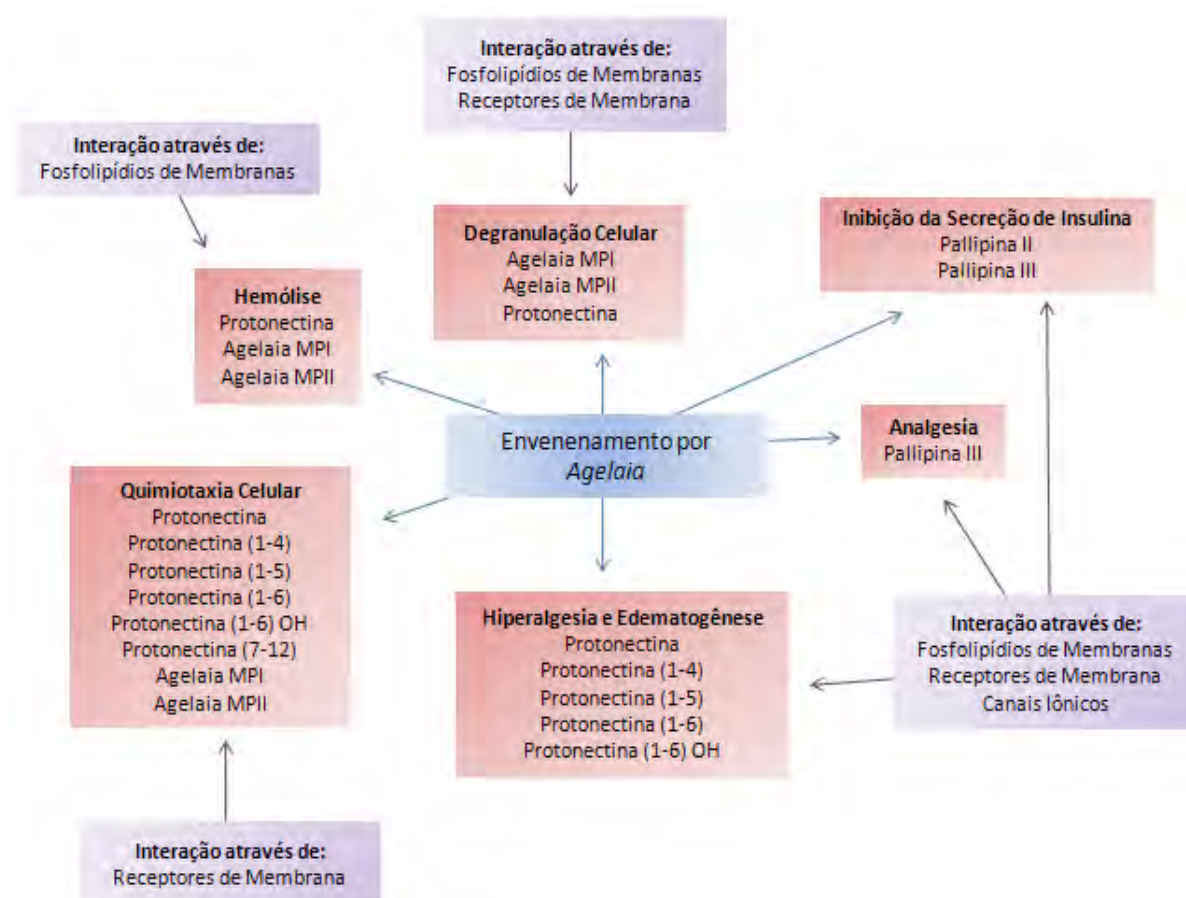


FIGURA 43: Esquema ilustrativo propondo possíveis mecanismos de ação dos peptídeos isolados dos venenos das vespas sociais *Agelaia pallipes pallipes* e *Agelaia vicina*.

No entanto, ainda não se sabe se o efeito de inibidor da secreção de insulina de células β pancreáticas, descrito para os peptídeos Pallipina-II e Pallipina-III, é um “acidente” ou se realmente uma das funções desses compostos é o de causar hipoglicemia transitória em vertebrados. Uma vez que a hipoglicemia pode causar diversos sintomas (devido ao fornecimento inadequado de glicose ao cérebro, prejudicando suas funções) (Scarpinato et al 1988, Mason 2008), esses efeitos poderiam contribuir com o desconforto causado pelo envenenamento por esses animais ou até mesmo potencializá-los. A descoberta de um número relativamente elevado de novos peptídeos e a elucidação de suas ações, certamente permite um aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos de envenenamento causados pelas ferroadas de vespas sociais, se refletirá em curto prazo na adoção de novas estratégias terapêuticas. Além disso, a descoberta de novos componentes peptídicos, com estruturas moleculares inéditas, apresentando ações multifuncionais, poderá fornecer elementos para o desenvolvimento racional de novas drogas de uso terapêutico, de natureza peptídica.

6 CONCLUSÕES

O presente projeto alcançou alguns dos principais objetivos do projeto BIOprospecTA/FAPESP, através da identificação e caracterização de compostos naturais de natureza peptídica, presentes nos venenos de espécies de vespas sociais, autóctones da fauna do Estado de São Paulo.

Além de abrir novas vertentes de estudos estruturais e funcionais, o presente projeto tem alcançado os objetivos inicialmente almejados, identificando e caracterizando estruturalmente doze moléculas peptídicas, presentes nos venenos das vespas sociais *Agelaia pallipes pallipes* e *Agelaia vicina*, autóctones da fauna do Estado de São Paulo. São elas:

- Quatro peptídeos pequenos, provavelmente produto de clivagem proteolítica a partir do peptídeo Protonectina;

- Dois mastoparanos, um já descrito anteriormente (*Agelaia* MP-I, Mendes et al 2004) enquanto que a sequência do segundo é nova;

- Três novos peptídeos, que possuem dois resíduos de cisteína cada, em suas sequências; característica esta, pouco encontrada em venenos de vespas sociais, até o momento. Aparentemente os três peptídeos são bastante conservados estruturalmente, quando suas sequências são comparadas entre si;

- Três correspondem a peptídeos pequenos, provavelmente produto de clivagem proteolítica a partir do peptídeo Protonectina (GLL-OH, GLLKGL-NH₂ e ILGTIL-OH);

- O mastoparano *Agelaia* MP-I, já descrito anteriormente (Mendes et al 2004);

- O peptídeo Protonectina, presente nos venenos das vespas sociais *Protonectarina sylveirae* (Dotsu et al 1993) e *Agelaia pallipes pallipes* (Mendes et al 2004);

Essas identificações mostram que os constituintes peptídicos presentes nos venenos das vespas sociais do gênero *Agelaia* são semelhantes entre si, provavelmente devido à proximidade de parentesco entre as duas espécies.

Com relação aos resultados funcionais obtidos para cada peptídeo estudado, temos que:

- *Agelaia* MP-I apresentou efeitos líticos e degranuladores em leucócitos de ratos e estimulador da secreção de insulina de camundongos por um mecanismo de ação diferente da interação com canais inônicos de K_{ATP} e C_L;

- *Agelaia* MP-II apresentou efeitos líticos e degranuladores em leucócitos de ratos menos potente que o *Agelaia* MP-I;

- Protonectina apresentou efeitos líticos, degranuladores e principalmente quimiotáticos além de induzir efeito hiperalgésico e edematogênico de maneira dose e tempo dependente, contribuindo com a inflamação e dor induzido por venenos das espécies;

- Protonectina (1-4)-OH apresentou atividade hemolítica e degranuladora de leucócitos;

- Protonectina (1-5)-OH apresentou atividade quimiotática e hiperalgésica de maneira dose e tempo dependente, contribuindo com a inflamação e dor induzido por venenos das espécies;

- Protonectina (1-6)-OH apresentou atividade quimiotática;

- Protonectina (1-6) apresentou atividade quimiotática e hiperalgésica de maneira dose e tempo dependente, contribuindo com a inflamação e dor induzido por venenos das espécies;

- Protonectina (7-12) apresentou atividade quimiotática;

- Pallipina-II promove a inibição da secreção de insulina na concentração de glicose 11.1 por mecanismo desconhecido;

- Pallipina-III apresentou atividade analgésica, revertendo a hiperalgésia causada pela carragenina e também é capaz de promover a inibição da secreção de insulina nas concentrações de glicose 11.1 e 22.2 por mecanismo ainda desconhecido.

Concluindo, esses resultados mostram a relevância de se estudar produtos naturais oriundos de venenos animais, uma vez que novas moléculas foram descobertas a partir dos venenos das vespas estudadas, mostrando a riqueza e diversidade desses compostos. Este trabalho também demonstra que re-analisar venenos de espécies previamente estudadas por técnicas ou estratégias *offline* (RP-HPLC seguido de análises de ESI-MS-MS/MS), dessa vez, utilizando-se de tecnologias mais avançadas como foi o caso deste estudo *on line* (LC-ESIMS-IT-TOF, cuja sensibilidade é muito maior), pode-se obter uma maior riqueza de informações.

7 REFERÊNCIAS

- ABE T, KAWAI N. Cardioactive effects of hornet venom, *Vespa mandarinia*. *Comp Biochem Physiol C*, 76:221-5, 1983.
- ADERMANN K, JOHN H, STÄNDKER L, FORSSMANN WG. Exploiting natural peptide diversity: novel research tools and drug leads. *Curr Opin Biotechnol*. 2004 Dec;15(6):599-606.
- AKASHI H, MATSUMOTO S, TAIRA K. Gene discovery by ribozyme and siRNA libraries *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:413-422, 2005.
- AMARAL AG, RAFACHO A, OLIVEIRA CAM, BATISTA TM, RIBEIRO RA, LATORRACA MQ, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. *Pancreas (in press)*, 2010.
- AMIN RH, CHEN HQ, VELUTHAKAL R, SILVER RB, LI J, LI G, KOWLURU A. Mastoparan-induced insulin secretion from insulin-secreting BTC3 and INS-1 cells: evidence for its regulation by Rho subfamily of G proteins. *Endocrinology* 144(10):4508-4518, 2003.
- ANTONICELLI L, BILO MB, BONIFAZI F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2:341-346, 2002.
- ASCROFT FM, HARRISON FM, ASCROFT SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat beta-cells. *Nature, London* 321:446-8, 1984.
- ASCROFT FM. Adenosine triphosphate sensitive K⁺ channels. *A Rev Neurosci* 11:97-118, 1988.
- ASCROFT FM, WILLIAMS B, SMITH PA, FEWTRELL CMS. Ion channels involved in the regulation of nutrient-stimulated insulin secretion. *Portland Press* 193-212, 1992.
- ARGIOLAS A, PISANO JJ. Facilitation for phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem. Washington*, 258(22):13697-13702, 1983.
- ARGIOLAS A, PISANO JJ. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and cabrolin, from venom of the european hornet, *Vespa cabro*. *J. Biol. Chem., Washington*, 59(16):101-106, 1984a.
- ARGIOLAS A, PISANO JJ. Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *J. Biol. Chem., Washington*, 260(3):1437-1444, 1984b.
- AYRES M, AYRES JUNIOR M, AYRES DL, SANTOS AS. *BioEstat 2.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas de Ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil de Mamirauá (Belém), Brasília, CNPq, 2000.
- BAPTISTA-SAIDEMBERG NB. Efeito das interações Peptídeo-Peptídeo e Peptídeo-Membrana nas Atividades Funcionais das Toxinas Peptídicas do Veneno da Vespa Social *Agelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera, Vespidae). Rio Claro, 67p. Dissertação em Biologia Celular e Molecular – IB/UNESP-Rio Claro, 2007.
- BAPTISTA-SAIDEMBERG NB, SAIDEMBERG DM, SOUZA BM, CÉSAR-TOGNOLI LMM, FERREIRA VMR, MENDES MA, CABRERA MPS, RUGGIERO NETO J, PALMA MS. Protonectin (1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon in press*, 2010.
-

-
- BARENHOLZ-PANIRY V, ISHAY JS, FREEMAN S, SOHMER H. Evoked potential changes in cats following injection of an extract from the venom sac of the oriental hornet (*Vespa orientalis*). *Toxicon* 28(11):1317-24, 1990.
- BARNETTE MS, DALY R, WEISS B. Inhibition of calmodulin activity by insect venoms. *Biochem. Pharmol.* 32:2929-2933, 1983.
- BOSCHERO AC, BORDIN S, SENER A, MALAISSE WJ. D-glucose and L-leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* 73:63-71, 1990.
- BARR-NEA L, ISHAY J. Histopathological changes in mouse and rat skin injected with venom sac extracts of the oriental hornet (*Vespa orientalis*). *Toxicon* 15(4):301-6, 1977b.
- BARR-NEA L, ISHAY J. Eosinophilia in mice and rats injected with oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom sac extract. *Toxicon* 15(5):375-8, 1977a.
- BARR-NEA L, SANDBANK M, ISHAY J. Pseudolymphoma of skin induced by oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom. *Experientia* 15;32(12):1564-5, 1976.
- BELEBONI RO, CAROLINO RO, PIZZO AB, CASTELLAN-BALDAN L, COUTINHO-NETTO J, DOS SANTOS WF, COIMBRA NC. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cell Mol Neurobiol* 24(6):707-28, 2004.
- BELEBONI R, PIZZO AB, FONTANA AC, DE O G CAROLINO R, COUTINHO-NETTO J, DOS SANTOS WF. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur J Pharmacol* 493(1-3):1-17, 2004.
- BERNSTEIN K. Neurogen drug deal with Pfizer. *BioWorld Today*, 10/02/1992. Disponível em: http://www.bioworld.com/servlet/com.accumedia.web.Dispatcher?next=bioworldToday_currentIssue&issueId=3886&prodID=4&month=02&year=1992 > Acesso em: 15 Janeiro de 2006.
- BRIGATTE P, CURY Y, DE SOUZA BM, BAPTISTA-SAIDEMBERG NB, SAIDEMBERG DM, PALMA MS. Hyperalgesic and edematogenic effect of peptides isolated from *Apis mellifera*, *Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae* insects. *Aminoacids*, 2010a.
- CAMPBELL ES, RICHTER W. An observational method estimating toxicity and drug actions in mice applied to 68 reference drugs. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 25, 345-63 (1967).
- CARNEIRO EM, TOYAMA MH, MARANGONI S, BARBOSA LC, BOSCHERO AC. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochimica and Biophysica Acta, Estados Unidos*, v. 14, p. 56-60, 2000.
- CARNEIRO EM, LATORRACA MQ, ARAUJO EP, BELTRA M, OLIVERAS MJ, NAVARRO M, BERNA G, BEDOYA FJ, VELLOSO LA, VELLOSO LA, SORIA B, MARTIN F. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20(7):503-511, 2009.
- CARVALHO CPF, MARTINS JCR, CUNHA DA, BOSCHERO AC, COLLARES-BUZATO CB. Histomorphology and ultra structure of pancreatic islets during in vivo maturation of rat pancreas. *Ann Anat* 188:221-234, 2006.
- CASE DA, PEARLMAN DA, CALDWELL JW, CHEATHAM III TE, WANG W S, ROSS WS, SIMMERLING CL, DARDEN TA, MERZ KM, STANTON RV, CHENG AL, VINCENT JJ,
-

-
- CROWLEY M, TSUI V, GOHLKE H, RADMER RJ, DUAN Y, PITERA J, MASSOVA I, SEIBEL GL, SINGH UC, WEINER PK, KOLLMAN PA. AMBER 7. University of California, San Francisco, 2002.
- CHAN WC, WHITE PD. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford University press, USA, p. 346, 2004.
- CHAY TR. The effects of inactivator of calcium channels by intracellular Ca^{2+} ions bursting pancreatic β cells. Cell Biophys 11:77-90, 1987.
- CHACUR M, PICOLO G, GUTIÉRREZ JM, TEIXEIRA CF, CURY Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon. 39(8):1173-81, 2001.
- CHEN HS, LEI J, HE X, QU F, WANG Y, WEN WW, YOU HJ, ARENDT-NIELSEN L. Peripheral involvement of PKA and PKC in subcutaneous bee venom-induced persistent nociception, mechanical hyperalgesia, and inflammation in rats. Pain. 135(1-2):31-6, 2008.
- CHEN W, YANG X, YANG X, ZHAI L, LU Z, LIU J, YU H. Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius. Peptides 29:1887-92, 2008.
- CHEN YN, LI KC, LI Z, SHANG GW, LIU DN, LU ZM, ZHANG JW, JI YH, GAO GD, CHEN J. Effects of bee venom peptidergic components on rat pain-related behaviors and inflammation. Neuroscience 138:631-40, 2006.
- CHEN H-Q, Veluthakal R, Palanivel R, Kowluru A. GTP-binding protein-independent potentiation by mastoparan of IL-1 β -induced nitric oxide release from insulin-secreting HIT-T15 cells. Apoptosis 9:145-148, 2004.
- CHOI OH, Padgett WL, Daly JW. Effects of the amphiphilic peptides mellitin and mastoparan on calcium influx, phosphoinositide breakdown and arachidonic acid release in rat pheochromocytoma PC-12 cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 260:369-375, 1992.
- CLAYTON AH, ATCLIFFE BW, HOWLETT GJ, SAWYER WH. Conformation and orientation of penetratin in phospholipid membranes. J Pept Sci, 12(3):233-8, 2006.
- COOK DL, Halles. Intracellular ATP directly bloc K^+ channels in pancreatic B. Nature, London 311:271-3, 1984.
- CORPET F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl Acids Res 16(22):10881-10890, 1988.
- CORSI MCC. Estudo dos peptídeos sintéticos em algumas etapas do mecanismo de secreção de insulina por células beta pancreáticas. 42p. (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- COSTA, H. Caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Angelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera-Vespidae). 122p. (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.
- CSORDÁS A, MICHL H. Isolation and structure of a hemolytic polypeptide from the defensive secretion of european *Bombina* species. Monatsh. Chem., Wien, 101:182-9, 1970.
- CLYNEN E, DE LOOF A, SCHOOF L. The use of peptidomics in endocrine research. Gen Comp Endocrinol. 2003 Jun 1;132(1):1-9.
-

-
- DANIEL S, NODA M, CERIONE RA, SHARP GWG. A link between cdc42 and Syntaxin is involved in Mastoparan-stimulated insulin release. *Biochemistry* 41:9663-9671, 2002.
- DANILENKO M, WORLAND P, CARLSON B, SAUSVILLE EA, SHARONI Y. Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein-directed and membrane perturbing activities. Orlando, *Biochem Biophys Res Commun*, 196(3):1296-302, 1993.
- DRAY A. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.* 75:125-131, 1995.
- DRAY A. Handbook of Experimental Pharmacology, 130, 21-41, 1997.
- DAYAN D, BARR-NEA L, SANDBANK M, BINDERMAN I, MECHANIC GL, ISHAY JS. Oriental hornet venom enhances wound healing and repair in rat skin, possibly through its collagenolytic activity. *Acta Trop* 40:147-53, 1983.
- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA., 2002.
- DE PAULA L, SANTOS WF, MALHEIRO A, CARLOS D, FACCIOLI LH. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a model of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. *Int Immunopharmacol* 6:182-9, 2006.
- DE SOUZA BM. Peptídeos policatiônicos do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Polistinae): estrutura e função. 2002.120 f. (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.
- DE SOUZA BM, MARQUES MR, TOMAZELA DM, EBERLIN MN, MENDES MA, PALMA MS. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, New Jersey, 18: 1095 – 1102, 2004.
- DE SOUZA BM, MENDES MA, SANTOS LD, MARQUES MR, CESAR LM, ALMEIDA RN, PAGNOCCA FC, KONNO K, PALMA MS. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, New York, 26(11):2157-64, 2005.
- DE SOUZA BM, PALMA, MS. Monitoring the positioning of short polycationic peptides in model lipid bilayers by combining hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry *Biochem. Biophys. Acta (BBA)*, 1778, 12: 2797-2805, 2008.
- DOHTSU K, OKUMURA K, PALMA MS, NAKAJIMA T. Isolation na sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Himenoptera – Vespidae). *Natural Toxins*, New York, 1:271-6, 1993.
- DOS SANTOS CABRERA MP, DE SOUZA BM, FONTANA R, KONNO K, PALMA MS, DE AZEVEDO JR WF, RUGIERO NETO J. Conformation and Lytic Activity of eumenine mastoparan: a New Antimicrobial Peptide from Wasp Venom. *J Peptide Res*, 64:95-103, 2004.
- DUNN RS, PARKS AM. A new plasmakinin in the turtle, *Pseudemys elegans*. *Experientia*, Basel, 26:1220-1, 1970.
- DUVDEVANI P, ISHAY JS, SCHEJTER A. Mastoparan induces hypothermia in mice. *Experientia* 47:460-2, 1991.
- EDERY H, ISHAY J, GITTER S, JOSHUA H. In: BETTINI, S. Venoms of Vespidae. Arthropod venoms. New York: Springer-Verlag, p.691-771, 1978.
-

-
- EDDLESTONE GT, KOMATSU M, SHEN L, SHARP GWG. Mastoparan increases the intracellular free calcium concentration in two insulin-secreting cell lines by inhibition of ATP-sensitive potassium channels. *Molec Pharmacol* 47:787-797, 1995.
- ENGLAND S, BEVIAN S, DOCHERTY RJ. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol. (Lond)* 495:429-440, 1996.
- ENO AE. Pharmacological investigation of oedema induced by venom from the wasp *Polistes fuscatus*. *Toxicon* 35:1691-8, 1997.
- EPAND RM, VOGEL HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam*, 1462:11-28, 1999.
- ESSMANN U, PERERA L, BERKOWITZ ML. A smooth particle mesh Ewald method. *New York, J Chem Phys*, 103(19):8577-93, 1995.
- FERREIRA SH. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin-like drugs and opiate-antagonists. *Br J Clin Pharmacol*;10(Suppl 2):237S-45S, 1980.
- FERREIRA SH, LORENZETTI BB. Glutamate spinal retrogradesensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology* 33, 1479, 1995.
- GARCIA N. Spider Bioprospection- NPS to seek novel drugs in Madagascar. *BioWorld Today*, 27/05/2003. Disponível em: <http://www.bioworld.com/servlet/com.accumedi.a.web.Dispatcher?next=bioworldToday_currentIssue&issueId=4215&prodID=4&month=05&year=1993> Acesso em: 15/01/2006.
- GAO Z, YOUNG RA, LI G, NAJAFI H, BUETTGER C, SUKUMVANICH SS, WONG RK, WOLF BA, MATSCHINSKY FM. Distinguishing features of leucine and alpha- ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 144(5):1949-57, 2003.
- GARCIA RF, GAZOLA VA, BARRENA HC, HARTAMANN EM, BERTI J, TOYAMA MH, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM, MANSO FC, BAZOTTE RB. Blood amino acids concentration during insulin induced hypoglycemia in rats: the role of alanine and glutamine in glucose recovery. *Amino Acids* 33:151-155, 2007.
- GAUTAM D, HAN SJ, DUTTARROY A, MEARS D, HAMDAN FF, LI JH, CUI Y, JEON J, N, WESS J. Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in beta-cell function and glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab* 9(2):158-69, 2007.
- GEMBAL M, DETIMARY P, GILSON P, GAO ZY, HENQUIN JC. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mouse β -cells. *J Clin Invest* 91:871-880, 1993.
- GIDDINGS SJ, CARNAGHI LR. Selective expression and developmental regulation of the ancestral rat insulin II gene in fetal liver. *Mol Endocrinol* 4(9):1363-9, 1990.
- GILSON P, HENQUIN JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22(5):565-604, 2001.
- GIL J, HIGGINS T, ROZENGURT E. Mastoparan, a novel mitogen for Swiss 3T3 cells, stimulates pertussis toxin-sensitive arachidonic acid release without inositol phosphate accumulation. *J Cell Biol* 113(4):943-50, 1991.
-

-
- GOLD MS, REICHLING DB, SHUSTER MJ, LEVINE JD. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:1108-1112, 1996.
- GONCALVES AA, TOYAMA MH, CARNEIRO EM, MARANGONI S, ARANTES EC, GIGLIO JR, BOSCHERO AC. Participation of Na⁺ channels in the potentiation by *Tityus serrulatus* x-toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet β -cells. *Toxicon* 2003.
- GRIESBACHER T, ALTHUBER P, ZENZ M, RAINER I, GRIENGL S, LEMBECK F. *Vesula vulgaris* venom: role of kinins and release of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. *Eur J Pharmacol.* 1998 Jun 12;351(1):95-104.
- GROSKY GM, BENNETT LL. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes* 15: 910-12, 1966.
- GUSOVSKY F, SOERGEL DG, DALY JW. Effects of mastoparan and related peptides on phosphoinositide breakdown in HL-60 cells and cell-free preparations. *Eur J Pharmacol* 26:309-314, 1991.
- GUYTON AC, HALL JE. *Fisiologia Humana e mecanismos das doenças*. Sexta edição. Editora Guanabara Koogan, 1998.
- HABERMANN E. Bee and wasp venoms. *Science, Washington*, 117:314-22, 1972.
- HANCOCK REW, CHAPPLE DS. Peptides antibiotics. Antimicrobial agents Chemotherapy, Bethesda, 43:1317-23, 1999.
- HANCOCK REW, DIAMOND G. The role of cationic antimicrobial peptides in host defenses. *TIMS, Providence*, 8:402-410, 2000.
- HARVEY JA, MCMASTER SE, ROMANO AG. Methylenedioxyamphetamine: neurotoxic effects on serotonergic projections to brainstem nuclei in the rat. *Brain Res* 619(1-2):1-14, 1993.
- HERBERT V, LAU K-S, GOTTLIEB CW, BLEICHER SJ. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol* 25:1375-1384, 1965.
- HIDE I, BENNETT JP, PIZZEY A, BOONEN G, SAGI D B, GOMPERTS BD, TATHAM PER. Degranulation of individual mast cell in response to Ca²⁺ and guanine nucleotides: an all-or-none event. *New York, J. Cell Biol.*, v.123, n.3, p.585-93, 1993.
- HIGASHIMA M, SAWADA S, YAMAMOTO C. Applicability of Pascal distribution to quantal analysis for non-stationary release of neurotransmitter. *Neurosci Lett.* 1990 Jul 31;115(2-3):231-6.
- HIGASHIJIMA T, UZU S, NAKAJIMA T, ROSS EM. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *The journal of Biological Chemistry, Washington*, 263(14):6491-6494, 1988.
- HIGASHIJIMA T, ROSS EM. Mapping of the mastoparan-binding site on G proteins: cross-linking of [251-Tyr³, Cys⁷]mastoparan to G₀. *J. Biol. Chem.* 266:12655-12661, 1991.
- HILLAIRE-BUYS D, MOUSLI M, LANDRY Y, BOCKAERT J, FEHRENTSZ JA, CARRETTE J, ROUOT B. Insulin releasing effects of mastoparan and amphiphilic substance P receptor antagonists on RINm5F insulinoma cells. *Mol Cell Biochem* 109(2):133-8, 1992.
- HIRAI Y, YASUHARA T, YOSHIDA H, NAKAJIMA T. A new mast cell degranulation peptide
-

-
- "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. Chem Pharm Bull, Tokyo, 27(8):1942-1944,1979a.
- HIRAI Y, KUWADA M, YASUHARA T, YOSHIDA H, NAKAJIMA T. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*) Chem Pharm Bull 27:1945-1946, 1979b.
- HIRAI Y, YASUHARA T, YOSHIDA H, NAKAJIMA T. A new mast cell degranulating peptide, Mastoparan-M in the venom of the Hornet *Vespa mandarina*. Biomed Res, 2: 447-449,1981a.
- HIRAI Y, YASUHARA T, YOSHIDA H, NAKAJIMA T. A new mast cell degranulating peptide, polistes mastoparan, in the venom of *Polistes jadwigae*. Biomed. Res. 1: 185-187, 1981b.
- HIRAI Y, YASUHARA T, YOSHIDA H, NAKAJIMA T. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. In SHIBA S. Peptide Chemistry, Osaka, Protein Research Foundation, p155-160, 1978.
- HIRIART M, AGUILAR-BRYAN L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. Am J Physiol Endocrinol Metab 295(6):1298-306, 2008.
- HO CL, KO JL. Hornetin: the lethal protein of the hornet (*Vespa flavitarsus*) venom. FEBS Lett 209:18-22, 1986.
- HO CH & HWANG LL. Local edema induced by the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom and its components. Toxicon 29(8):1033-42, 1991.
- HO CL, HWANG LL. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. Biochem J 274 (Pt 2):453-6, 1991a.
- HO CL, HWANG LL. Local edema induced by the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom and its components. Toxicon 29(8):1033-42, 1991b.
- HO CL, HWANG LL, CHEN CT. Edema-inducing activity of a lethal protein with phospholipase A1 activity isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. Toxicon 31:605-13, 1993.
- HO CL, HWANG LL, LIN YL, CHEN CT, YU HM, WANG KT. Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requirements. Eur J Pharmacol Amsterdam, 259:259-64, 1994.
- HO CL, LIN YL, CHEN WC, HWANG LL, YU HM, WANG KT. Structural requirements for the edema-inducing and hemolytic activities of mastoparan B isolated from the hornet (*Vespa basalis*) venom. Toxicon 34(9):1027-35, 1996.
- HO CL, CHEN WC, LIN YL. Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. Toxicon, Elmstford, 36(4):609-17, 1998.
- HO CL, SHIH YP, WANG KT, YU HM. Enhancing the hypotensive effect and diminishing the cytolytic activity of hornet mastoparan B by D-amino acid substitution. Toxicon 39:1561-6, 2001.
- HOLZ GG, LEECH CA, HABENER JF. Insulinotropic toxins as molecular probes for analysis of glucagon-likepeptide-1 receptor-mediated signal transduction in pancreatic beta-cells. Biochimie 82(9-10):915-26, 2000.
- HORI Y, DEMURA M, IWADATE M, ULRICH AS, NIIDOME T, AOYAGI H, ASAKURA T. Interaction of mastoparan with membranes studies by ¹H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid phase ²H-NRM and ¹⁵H-NRM spectroscopy in oriented lipid bilayers. Berlin, Eur J Biochem, 268:3029, 2001.
-

-
- HUGHES WO, RATNIEKS FL, OLDROYD BP. Multiple paternity or multiple queens: two routes to greater intracolony genetic diversity in the eusocial Hymenoptera. *J Evol Biol* 21:1090-5, 2008.
- HUMPHREY WF, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: Visual Molecular Dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, Guildford, 14:33-38, 1996.
- INUWA IM, EL MARDI AS. Correlation between volume fraction and volume-weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *J Anat* 206(2):185-92, 2005.
- ISHAY JS. Anticholinesterase-like activity by oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom and venom sac extract. *Experientia* 35:636-9, 1979.
- ISHAY JS, YALON ME. Intraocular pressure reduction induced by hornet venom in the normal eye. *Acta Trop* 39(2):171-8, 1982.
- ISHAY JS, SHEMESH E, LILLING I. Hypothermia induced in mice by injection of venom sac extract of hornets (*Vespa orientalis*, vespinae: hymenoptera). *Experientia* 39(1):53-5, 1983.
- JACOB JJ, RAMABADRAN K. Enhancement of a nociceptive reaction by opioid antagonists in mice. *Br J Pharmacol* 64, 91-8 (1978).
- JENSEN K, ANDERSEN HO, OLESEN J, LINDBLOM U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain* 25:313-323, 1986.
- JONES PM, MANN FM, PERSAUD SJ, WHEELER-JONES CPD. Mastoparan stimulates insulin secretion from pancreatic β -cells by effects at a late stage in the secretory pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 94:97-103, 1993.
- JOOST HG, THORENS B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol.* 2001 Oct-Dec;18(4):247-56.
- JORGENSEN WL, CHANDRASEKHAR J, MADURA JD, IMPEY RW, KLEIN ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. New York, *J Chem Phys*, 79:926-35, 1983.
- JOYCE-BRADY M, RUBINS JB, PANCHENKO MP, BERNARDO J, STEELE MP, KOLM L, SIMONS BR, DICKEY BF. Mechanisms of mastoparan stimulated surfactant secretion from isolated pulmonary alveolar type 2 cells. *J. Biol. Chem.* 266:6859-6865, 1991.
- KABSCH W, SANDER C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. New York, *Biopolymers*, 22:2577-637, 1983.
- KAM J, WARON M, BARISHAK YR, SCHACHNER E, ISHAY JS. Intraocular pressure in cats is lowered by drops of hornet venom. *Comp Biochem Physiol C* 92:329-31, 1989.
- KATSU T, SANCHIKA K, TAKAHASHI M, KISHIMOTO Y, FUJITA Y, YOSHITOMI H, WAKI M, SHIMOHIGASHI Y. Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. Amsterdam, *Biochim Biophys Acta*, 1027(2):185-90, 1990.
- KING GF. The wonderful world of spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. *Toxicon*, Elmsford, 43:471-475, 2004.
- KISHIMURA, H, YASUHARA, T, YOSHIDA, H, NAKAJIMA, T. Vespakinin-M, a novel bradikynin analogue containing hydroxyl-proline, in the venom of *Vespa mandarinia* Smith. *Chem Pharm*
-

-
- Bull, 24: 2896-2897, 1976.
- KLEINBAUM DG, KUPPER LL, MULLER KE, NIZAM A. Analysis of repeated measures data. In: Brooks/Cole Publishing Company (eds), Applied Regression Analysis and other Multivariable Methods, Brooks/Coles Publishing Company, New York, NY, p. 589-638, 1998.
- KOBAYASHI, K.; MCBURNEY, R. N.; GOLDIN, S. M. Venoms and Toxins as Sources of Drug Leads. In: New Drugs from Natural Sources, Information Press, Oxford, 1992.
- KOMATSU M, AIZAWA T, YOKOKAWA N, SATO Y, OKADA N, TAKASU N, YAMADA T. Mastoparan-induced hormone release from rat pancreatic islets. *Endocrinology* 130(1):221-8, 1992.
- KOMATSU M, MCDERMOTT AM, GILLISON SL, SHARP GWG. Mastoparan stimulates exocytosis at a Ca²⁺-independent late site in stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem* 268(31):23297-23306, 1993.
- KONNO K, HISADA M, ITAGAKI Y, NAOKI H, KAWAI N, MIWA A, YASUHARA T, TAKAYAMA H. Isolations and structure of pompilotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, 250:612-616, 1998.
- KONNO K, HISADA M, NAOKI H, ITAGAKI Y, KAWAY N, MIWA A, YASUHARA T, MOTIMOTO Y, NAKAY Y. Structure and biological activities of eumenine mastoparan – AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in venom of solitary wasp (*Antenynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*, Elmsford, 38:505-515, 2000.
- KONNO K, HISADA M, NAOKI H, ITAGAKI Y, YASUHARA T, JULIANO MA, JULIANO L, PALMA MS, YAMANE T, NAKAJIMA T. Isolation and sequence determination of peptides in the venom of the spider wasp (*Cyphononyx dorsalis*) guided by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Toxicon* 39(8):1257-60, 2001.
- KONNO K, HISADA M, FONTANA R, LORENZI CCB, NAOKI H, ITAGAKI Y, MIWA A, KAWAI N, NAKATA Y, YASUHARA T, RUGGIERO NETO J, AZEVEDO WF, PALMA MS, NAKAJIMA T. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Bioch Biophys Acta*, Amsterdam, 1550:70-80, 2001a.
- KONNO K, PALMA MS, HITARA IY, JULIANO MA, JULIANO L, YASUHARA T. Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. *Toxicon*, Elmsford, 40(3):309-12, 2002.
- KONNO K, HISADA M, NAOKI H, ITAGAKI Y, FONTANA R, RANGEL M, OLIVEIRA JS, DOS SANTOS-CABRERA MP, RUGGIERO-NETO J, HIDE I, NAKATA Y, YASUHARA T, NAKAJIMA T. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides*, 27, 11: 2624-2631, 2006.
- KONRAD RJ, YOUNG RA, RECORD RD, SMITH RM, BUTKERAIT P, MANNING D, JARETT L, WOLF BA. The heterotrimeric G-protein Gi is located to the insulin secretory granules of b-cells and is involved in insulin exocytosis. *J Biol Chem* 270(21):12869-12876, 1995.
- KOSTER R, ANDERSON M, DE BEER EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proc.* 18, 412-26 (1959).
- KORADI R, BILLETER M, WUTHRICH K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, Guildford, 14:51-55, 1996.
- KRISHNAKUMARI V, NAGARAJI R. Antimicrobial and hemolytic activities of cabrolin, a 13-residue peptide from the venom of European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. *J. Peptide Res*,
-

-
- Copenhagen, 50:88-93, 1997.
- KOWLURU A, SEAVEY SE, RABAGLIA ME, METZ SA. Non specific stimulatory effects of mastoparan on pancreatic islet nucleoside diphosphokinase activity: dissociation from insulin secretion. *Biochem Pharmacol* 49(2):263-266, 1995.
- KOWLURU A. Identification and characterization of a novel protein histidine kinase in the islet B: evidence for its regulation by mastoparan, an activator of G-proteins and insulin secretion. *Biochem Pharmacol* 63:2091-2100, 2002.
- KURIHARA H, KITAJITNA K, SENDA T, FUJITA H, NAKAJIMA T. Multigranular exocytosis induced by phospholipase A₁ activators, mellitin and mastoparan, in rat anterior pituitary cells. *Cell Tissue Res.* 243:311-316, 1986.
- KURODA Y, YOSHIOKA M, KOBAYASHI K, NAKAJIMA T. Effects of peptides on the release of catecholamines and adenine nucleotides from cultured adrenal chromaffin cells. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Tokyo*, 56:660-4, 1980.
- KINOSHITA E, MAEJIMA H, YAMAOKA K, KONNO K, KAWAI N, SHIMIZU E, YOKOTE S, NAKAYAMA H, SEYAMA I. Novel wasp toxin discriminates between neuronal and cardiac sodium channels. *Mol Pharmacol.* 59(6):1457-63, 2001.
- LASKOWSKI RA, MACARTHUR MW, MOSS DS, THORNTON JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Copenhagen, J Appl Cryst*, 26:283-91, 1993.
- LEVINE JD, FIELD HL, BASBAUM AI. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J. Neurosci.*, 13: 2273-2286, 1993.
- LIPPINCOTT J, APOSTOL I. Carbamylation of cysteine: a potential artifact in peptide mapping of hemoglobins in the presence of urea. *Anal Biochem.* 267(1):57-64, 1999.
- LI C, BUETTGER C, KWAGH J, MATTER A, DAIKHIN Y, NISSIM IB, COLLINS HW, YUDKOFF M, STANLEY CA, MATSCHINSKY FM. A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J Biol Chem* 279(14):13393-401, 2004.
- LITCHFIELD JR JT, WILCOXON F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96, 99-113 (1949).
- LORENZI CCB. Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 115p. 2005.
- LOEW LM. In: *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, ed. Mason WT p.150-160, 1993.
- L'VOV VM, KOLMAKOVA AA, AKHUNOV A. Structural-functional characteristics of vasoactive peptides from the *Vespa orientalis* venom. *Ukr Biokhim Zh* 62(3):38-43, 1990.
- MALAISSÉ WJ, SENER A, HERCHUELZ A, HUTTON JC. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28(4):373-86, 1979.
- MALENCIK DA, ANDERSON SR. High affinity binding of the mastoparans by calmodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:50-16, 1983.
- MARAMGONI S, TOYAMA MH, ARANTES EC, GIGLIO JR, SILVA CA, CARNEIRO EM, GONCALVES AA, OLIVEIRA B. Amino Acid Sequence Of Tstx-V, An Alfa-Toxin From
-

-
- Tityus Serrulatus* Scorpion Venom, And Its Effect On K Permeability Of B-Cells From Isolated Rat Islets Of Langerhans. *Biochimica et Biophysica ACTA* 1243:309-314, 1995.
- MARENAH L, FLATT PR, ORR DF, MCCLEAN S, SHAW C, ABDEL-WAHAB YH. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures. *Biol Chem* 385(3-4):315-21, 2004.
- MASON EE. Gila monster's guide to surgery for obesity and diabetes. *J Am Coll Surg* 206(2):357-60, 2008.
- MATSUZAKI K, MURASE O, MIYAJIMA K. Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. *Washington, Biochemistry*, v.34, n.39, p.12553-9, 1995.
- MAYO KH, HASEMAN J, YOUNG HC, MAYO JW. Structure-function relationships in novel peptide dodecamers with broad-spectrum bactericidal and endotoxin-neutralizing activities. *Biochem. J.* 349: 717-728, 2000.
- MANZOLI-PALMA MF, PALMA MS. Aspectos entomológicos das alergias provocadas por ferroadas de Hymenoptera sociais. *Revista da SBAI* 15:23-125, 1992.
- MANZOLI-PALMA MF, GOBBI N, PALMA MS. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 9(2):174-185, 2003.
- MCCLLENAGHAN NH. Physiological regulation of the pancreatic beta-cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes. *Exp Physiol* 92(3):481-96, 2007.
- MECCLSKEY MC, FOX AP, FELDMAN D, TISIEN RW. Different types of calcium channels. *J Exp Biol* 124:177-190, 1986.
- MEGLASSON MD, MATSHCHINSKY FM. New perspectives on pancreatic islets glucokinase. *Am J Physiol*, 246:E1-E13, 1984.
- MEINWALD J. 2000 presentation. Science on the Frontiers. Disponível em: <[Http://www.rescorp.org/science%20frontiers/meinwald.pd](http://www.rescorp.org/science%20frontiers/meinwald.pd)>. Acesso em: 13 Set. 2004.
- MELLOR IR, SANSOM MS. Ion-channel properties of mastoparan, a 14-residue peptide from wasp venom, and of MP3, a 12-residue analogue. *London, Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.*, v.239, n.1296, p.383-400, 1990.
- MENDES MA, SOUZA BM, SANTOS LD, PALMA MS. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes* by high performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, New Jersey, 18(7), 2004a.
- MENDES MA, SOUZA BM, MARQUES MR, PALMA MS. Structural and biological of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon*, Elmsford, 44:67-74, 2004b.
- MENDES MA, MONSON DE SOUZA B, DELAZARI DOS SANTOS L, PALMA MS. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 18(6):636-42, 2004c.
- MENDES MA, SOUZA BM, PALMA MS. Structural and biological of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon*, Elmsford, 45:101-106, 2005.
-

-
- MENDES MA, PALMA MS. Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Peptides*, New York, 27:2632-2639, 2006.
- MERRIFIELD, B. Solid-Phase synthesis. Washington: Science, v.232, p.341-7, 1986.
- MIZUNO K, NAKAHATA N, OHIZUMI Y. Characterization of Mastoparan-Induced Histamine Release from RBL-2H3 Cells. *Toxicon*, Elmsford, 36(3):447-456, 1998.
- MOERMAN L, BOSTEELS S, NOPPE W, WILLEMS J, CLYNEN E, SCHOOF L, THEVISSSEN K, TYTGAT J, VAN ELDERE J, VAN DER WALT J, VERDONCK F. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Berlin, Eur J Biochem* 269:4799-4810, 2002.
- MONOI N, USUI M, TAKAHASHI S, ITO H, KUMAKURA K, KASAI H. Tetrapeptides on N- and C-terminal regions of mastoparan inhibit catecholamine release from chromaffin cells by blocking nicotinic acetylcholine receptor. *Cell Mol Neurobiol* 24(1):37-50, 2004.
- MORRIS AL, MACARTHUR MW, HUTCHINSON EG, THORNTON JM. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12:345-64, 1992.
- MORTARI MR, CUNHA AO, DE OLIVEIRA L, VIEIRA EB, GELFUSO EA, COUTINHO-NETTO J, FERREIRA DOS SANTOS W. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97:289-95, 2005.
- MORTARI MR, CUNHA AO, FERREIRA LB, DOS SANTOS WF. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacol Ther* 114(2):171-83, 2007.
- MOUSLI M, BRONNER C, BUEB J-L, TSCHIRHART E, GIES J-P, LANDRY Y. Activation of rat peritoneal mast cells by substance P and mastoparan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250:329-335, 1989.
- MOUSLI M, BUER JL, BRONNER C, ROUOT B, LANDRY Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *TIPS*, Elon College, 11:358-62, 1990.
- MUGLIA L, LOCKER J. Extrapancratic insulin gene expression in the fetal rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(12):3635-3639, 1984.
- MURATA K, SHINADA T, OHFUNE Y, HISADA M, YASUDA A, NAOKI H, NAKAJIMA T. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. *Biol Pharm Bull*, Tokyo, 29(12):2493-2497, 2006.
- MURATA K, SHINADA T, OHFUNE Y, HISADA M, YASUDA A, NAOKI H, NAKAJIMA T. Novel mastoparan and protonectin analogs isolated from a solitary wasp, *Orancistrocerus drewseni drewseni*. *Amino Acids* 37:389-394, 2009.
- NAGASHIMA K, KOIKE M, SAITO K, YASUHARA T, TSUKAMOTO Y, MORI M, FUJINO M, NAKAJIMA T. Role of lysine residue at 7th position of wasp chemotactic peptides. *Biochem. and Bioph. Research Commun.*, Orlando, 168:844-849, 1990.
- NAKAHATA N, ABE MT, MATSUOKA I, NAKARNISHI HX. Mastoparan inhibits phosphoinositide hydrolysis via pertussis toxin-insensitive Gprotein in human astrocytoma cells. *FEBS Lett.* 260:91-94, 1989.
-

-
- NAKAJIMA T, YASUHARA T, UZU S, WAKAMATSU K, MIYAZAWA T, FUKUDA K, TSUKAMOTO Y. Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. *Peptides* 3(6):425-30, 1985.
- NAKAJIMA T, YASUHARA T, ERSPAMER GF, VISSER J. Occurrence of Hyp³-bradykinin in methanol extracts of the skin of the South African lepidopteran from *Heleopryne purcelli*. *Experientia*, Basel,35:1133, 1979.
- NAKAJIMA T, UZU S, WAKAMATSU K, SAITO K, MIYAZAWA T, YASUHARA T, TSUKAMOTO Y, FUJINO M. Amphiphilic peptides in wasp venom. *Biopolymers*, New York, 25:115-21, 1986.
- NAZIMOV IV, SNEZHKOVA LG, MIROSHNIKOV AT. Structure and properties of mastoparan II. Na oligopeptide from the venom of *Vespa orientalis* hornet. Proc. 3d Symp. Chem. Pept. Prot.: USSR, 1980.
- NELSON DL, COX MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3.ed. New York, Worth Publishers, p.390, 2000.
- NESHER R, ANTEBY E, YEDOVIZKY M, WARWAR N, KAISER N, CERASI N. Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes* 51(1):S68-73, 2002.
- NEUMAN MG, ISHAY JS, WARON M, SCAPA E, ESHCHAR J. Hepatotoxic effects of repeated administration of oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom. *J Clin Lab Anal* 4:453-5, 1990.
- NORBERTO DE SOUZA O, ORNSTEIN RL. Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model. *New York, J Biomol Struct Dyn*, 16(6):1205-18, 1999.
- NOWYCKY MC, FOX AP, TISIEN RW. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443, 1985.
- OHARA-IMAIZUMI M, NAKAMICHI Y, OZAWA S, KATSUTA H, ISHIDA H, NAGAMATSU S. Mastoparan stimulates GABA release from MIN6 cells: relationship between SNARE proteins and mastoparan action. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1025-1030, 2001.
- OKANO Y, TAKAGI H, TOHMATSU T, NAKASHIMA S, KURODA Y, SAITO K, NOZAWA Y. A wasp venom mastoparan-induced polyphosphoinositide breakdown in rat peritoneal mast cells. *FEBS Lett*. 188:363-366, 1985.
- OMATA W, SUZUKI Y, KOJIMA J, SHIBATA H. Duality in the mastoparan action on glucose transport in rat adipocytes. *Endocrine J* 52(4):395-405, 2005.
- OLIVEIRA MR. Fracionamento e caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Polybia paulista*. Dissertação (Mestrado em Biológica Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 100p. 2000.
- OLIVEIRA L, CUNHA AOS, MORTARI MR, PIZZO AB, MIRANDA A, COIMBRA NC, SANTOS WF. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. *Brain Research* 1031:74-78, 2005a.
- OLIVEIRA L, CUNHA AOS, MORTARI MR, COIMBRA NC, DOS SANTOS WF. Cataleptic Activity of the denatured venom of the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Progress in Neuro-Psychopharmacologic & Biological Psychiatry*, 30(2):198-203, 2005b.
- OKUMURA K, INUI K, HIRAI Y, NAKAJIMA T. The effect of mastoparan on ion movement in black
-

-
- lipid membrane. *Biomed. Res, Tokyo*, 2:450-2, 1981.
- ORCI L, RAVAZZOLA M, AMHERDT M, MADSEN O, VASSALLI JD, PERRELET A. Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells. *Cell* 42(2):671-81, 1985.
- OVERBYE KM, BARRETT JF. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today* 10(1):45-52, 2005.
- OZAKI Y, MATSUMOTO Y, YATOMI Y, HIGASHIHARA M, KARIYA T, KUME S. Mastoparan, a wasp venom, activates platelets via pertussis toxin sensitive GTP-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:779-785, 1990.
- PALMA MS, BRAGA MRB. Venenos de "Hymenoptera" sociais: Coleta, composição, bioquímica e mecanismos de ação. In: BARRAVIERA, B. (Org). Venenos animais – Uma visão integrada. EPUC, RJ, p.251-258, 1994.
- PALMA MS. Insect venom peptides. In Kasting, A. Handbook of biologically active peptides. Elsevier: Burlington, 2006.
- PALMA C, MINGHETTI L, ASTOLFI M, AMBROSINI E, SILBERSTEIN FC, MANZINI S, LEVI G, ALOISI F. Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E2 production. *Glia* 21:183-93, 1997a.
- PALMA MS, ITAGAKI Y, FUJITA T, HISADA M, NAOKI H, NAKAJIMA T. Mass spectrometric structure determination of spider toxins: arginine-containing acylpolyamines from venoms of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. *Nat Toxins* 5:47-57, 1997b.
- PANTALEON M, KAYE PL. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod* 3(2):77-81, 1998.
- PARK R. Bee and Hymenoptera stings. *Emedicine* 3(1), 2002. (www.emedicine.com).
- PARK NG, YAMATO Y, LEE S, SUGIHARA G. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. *Biopolymers*, New York, 36:793-801, 1994.
- PARK NG, YAMATO Y, LEE S, SUGIHARA G. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Tawian with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. *Biopolymers*, New York, 36:793-801, 1995.
- PEARLMAN DA, CASE DA, CALDWELL JW, ROSS WS, CHEATHAM III TE, DeBOLT S, FERGUSON D, SEIBEL G, KOLLMAN P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to stimulate the structural and energetic properties of molecules. *Amsterdam, Comp Phys Commun* 91:1-41, 1995.
- PERIANIN A, SNYDERMAN R. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol triphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 143:1669-1673, 1989.
- PICOLO G, HISADA M, MOURA AB, MACHADO MF, SCIANI JM, CONCEIÇÃO IM, MELO RL, OLIVEIRA V, LIMA-LANDMAN MT, CURY Y, KONNO K, HAYASHI MA. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. *Biochem Pharmacol* 79(3):478-86, 2010.
-

-
- PIEK T, HUE B, MANTEL P, NAKAJIMA T, PELHATE M, YASUHARA T. Threonine6-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS. *Comp Biochem Physiol C* 96(1):157-62, 1990.
- PIEK T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon*. 29(2):139-49, 1991.
- PIEK T, HUE B, LE CORRONC H, MANTEL P, GOBBO M, ROCCHI R. Presynaptic block of transmission in the insect cns by mono- and di-galactosyl analogues of vespulakinin 1, a wasp (*Paravespula maculifrons*) venom neurotoxin. *Comp Biochem Physiol C*. 105(2):189-96, 1993.
- PISANO JJ. Vasoactive peptides in venoms. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bethesda, 27:58-62, 1968.
- PIZZO AB, BELEBONI RO, ANDRÉIA CK, FONTANA ACK, RIBEIRO AM, MIRANDA A, COUTINHO-NETTO J, DOS SANTOS, WF. Characterization of the action of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *J Biochem Mol Toxicol*, New York, 18(2):61-68, 2004.
- QUESADA I, ROVIRA JM, MARTIN F, ROCHE E, NADAL A, SORIA B. *PNAS* 99(14): 9544-9549, 2002.
- RAJAN AS, HILL RS, BOYD AE. Effect of rise in cAMP levels in Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in Hit cells: second-messenger synarchy in β cells. *Diabetes* 38:874-880, 1989.
- RAMACHANDRAN GN. Protein structure and crystallography. Washington, Science 141(357):288-91, 1963.
- RAMAKRISHNAN C, RAMACHAN GN. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations .2. Allowed conformations for a pair of peptide units. *New York, Biophysical Journal* 5(6):909-33, 1965.
- REEH PW. Chemical excitation and sensitization of nociceptors. In: Urban, L. (Ed.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 119-131, 1994.
- RIBEIRO SP, MENDES MA, SANTOS LD, SOUZA BM, MARQUES MR, AZEVEDO JR WF, PALMA MS. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 25(12):2069-2078, 2004.
- RIBEIRO RA, BONFLEUR ML, AMARAL AG, VANZELA EC, ROCCO AS, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 25:370-379, 2009.
- RIBEIRO RA, VANZELA EC, OLIVEIRA CAM, BONFLEUR ML, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. Taurine supplementation: involvement of cholinergic / phospholipase C and pKa pathways in potentiation of insulin secretion and Ca^{2+} handling in mouse pancreatic islets. *British Journal of Nutrition (in press)* 2010.
- ROCHA E SILVA, M, BERALDO, WT, ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-273, 1949.
- ROCHA T, SOARES DE BARROS LL, FONTANA K, MONSON DE SOUZA B, PALMA MS, ALICE DA CRUZ-HÖFLING M. Inflammation and apoptosis induced by mastoparan *Polybia*-M_{PII} on skeletal muscle. *Toxicon*, 2010.
- ROHL CA, BALDWIN RL. Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods Enzymol* 295:1-26,
-

-
- 1998.
- ROSS EM, HIGASHIJIMA T. Regulation of G-protein activation by mastoparans and other cationic peptides. *Methods in Enzymol* New York, 237:26-37, 1994.
- RUBIN Y, DUVDEVANI P, ISHAY JS. Cardiovascular haemodynamics of oriental hornet venom sac extract. *Pharmacol Toxicol* 72:268-72, 1993.
- SAHARA Y, GOTOH M, KONNO K, MIWA A, TSUBOKAVA H, ROBINSON HP, KAWAIN. A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current. *Oxford, Eur J Neurosci*, 12(6):1961-70, 2000.
- SALI, A. & BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, v.234, p.779-815, 1993.
- SANDBANK M, BARR-NEA L, ISHAY J. Pseudolymphoma of skin induced by oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom ultrastructural study. *Arch Dermatol Res* 262(2):135-41, 1978.
- SAIDEMBERG DM. Bioprospecção e Caracterização Químico-Funcional de Compostos Orgânicos de Baixas Massas Moleculares de Venenos das Vespas Sociais: *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista* (Hymenoptera - Vespidae) Tese em Biologia Celular e Molecular – IB/UNESP-Rio Claro, 2009.
- SAIDEMBERG DM, SILVA-FILHO LC, CESAR-TOGNOLI LMM, TORMENA CF, PALMA MS. Polybioside: a Neuroactive Compound from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. *Journal of Natural Products*, 2010.
- SCARPIGNATO C, GIOFFRÉ M, GULINO FM, MICALI B. Different effects of bombesin on glucose- and tolbutamide-induced insulin release in man. *Br J Pharmacol* 94(4):1023-8, 1998.
- SCHENBERG S, PEREIRA-LIMA FA. *Phoneutria nigriventer* venom, pharmacology and biochemistry of its components. In: Bucherl, W., Buckley, E.E. (Eds.), *Venomous Animals and Their Venoms*. Academic Press, New York, NY, pp. 279–285, 1971.
- SCOTT AM, ATWATER I, ROJAS E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1981 Nov;21(5):470-5.
- SENGUPTA D, LEOTIADOU H, MARK AE, MARRINK SJ. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:2308–2317, 2008.
- SALI A, BLUNDELL TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234:779-815, 1993.
- SCHMIDT JO. Hymenopteran venoms: striving toward the ultimate defense against vertebrates. In: *Insect defenses mechanisms and strategies of prey and predators*. Albany: New York Press 387-419, 1990.
- SCHROEDER EK. Efeito das mutações I16T, T21V, I47T E S94A na afinidade da enzima 2-trans-Enoil-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis* pelo cofator NADH: Estudos por simulação pela dinâmica molecular e *docking* molecular. Porto Alegre, 203p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade do Rio Grande do Sul, 2004.
- SCHULZ-KNAPPE P, ZUCHT HD, HEINE G, JÜRGENS M, HESS R, SCHRADER M. Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. *Comb Chem High*
-

-
- Throughput Screen, 4(2):207-17, 2001.
- SEATTER MJ, GOULD GW. The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family. *Pharm Biotechnol.* 12:201-28, 1999.
- STEEN CJ, JANNIGER CK, SCHUTZER SE, SCHWARTZ RA. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. *Int J Dermatol* 44:91-94, 2005.
- SMITH PE, PETTIT BM, KARPLUS M. Stochastic dynamic simulation of the alanine dipeptide using a solvent-modified potential energy surface. *Ithaca, J Phys Chem* 97:6907-13, 1993.
- SNEDECOR GM. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology (The Iowa State University, Press Ames, USA, Iowa, 1956).
- SOKAL RR, ROHLF FJ. *Biometry* (ed. Co WHF) (New York, 1981).
- SONE H, KAGAWA Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia.* 2005 Jan;48(1):58-67.
- SPRADBERY JP. *Wasps – An Account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps.* *Sidgwick & Jackson*, London, p.1-12, 1973.
- STARK GR, Reactions of cyanate with functional groups of proteins. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, 4(6):1030-6, 1965.
- STOPPIGLI FL, NOGUEIRA AT, LEITE RA, CARNEIRO EM, BOSCHERO AC. Protective effect of D-glucose, L-leucine, and fetal calf serum against oxidative stress in neonatal pancreatic islet. *Biochem Biophys Acta* 1588:113-118, 2002.
- STRAUB SG, JAMES RFL, DUNNE MJ, SHARP GWG. Glucose argumentation of mastoparan-stimulated insulin secretion in rat and human pancreatic islets. *Diabetes* 47:1053-1057, 1998.
- STRAUB SG, SHARP GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18(6):451-63, 2002.
- STRUGEES NC, ASHFORD MLJ, CARRINGTON CA, HALES CN. Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line. *J Endocrinol* 109:201-7, 1986.
- SWOPE SL, SHONBRUNN A. Bombesin stimulates insulin secretion by a pancreatic islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1822-1826, 1984.
- SWOPE SL, SCHONBRUNN A. Characterization of ligand binding and processing by bombesin receptors in an insulin-secreting cell line. *Biochem J.* 1987 Nov 1;247(3):731-8.
- SWOPE SL, SHONBRUNN A. The biphasic stimulation of insulin secretion by Bombesin involves both cytosolic free calcium and protein kinase C. *Biochem* 253:193-202,1998.
- TANIMURA A, MATSUMOTO Y, TOJYO Y. Mastoparan increases membrane permeability in rat parotid cells independently of action on proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177:802-808, 1991.
- THORENS B, SARKAR HK, LODISH HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and b pancreatic islets cells. *Cell* 55:281-90, 1988.
- TODOKORO Y, YUMEN I, FUKUSHIMA K, KANG SW, PARK JS, KOHNO T, WAKAMATSU K,
-

-
- AKUTSU H, FUJIWARA T. Structure of tightly membrane-bound mastoparan-X, a G-protein activating peptide, determined by solid state NMR. *Biophysical Journal*, New York 9:1368-1379, 2006.
- TOKI T, YASUHARA T, NAKAJIMA T. Isolation and sequential analysis of peptides on the venom sac of *Parapolybia indica*. *Jpn. J. Saint. Zool.*, Tokyo, 39(2):105-11, 1988.
- TREEDE RD, COLE JD. Dissociated secondary hyperalgesia in a subject with a large-fibre sensory neuropathy. *Pain* 53, 169-174, 1993.
- TUICHIBAEV MU, AKHMEDOVA NU, KAZAKOV I, KORNEEV AS, GAGEL'GANS AI. [Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*. Structure and function] *Biokhimiia*. 53(2):219-26, 1988.
- TURILLAZZI S, MASTROBUONI G, DANI FR, MONETI G, PIERACCINI G, LA MARCA G, BARTOLUCCI G, PERITO B, LAMBARDI D, CAVALLINI V, DAPPORTO L. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom* 17:376-83, 2006.
- UEBERHEIDE BM, FEYNÖ D, ALEWOOD PF, CHAIT BT. Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. *PNAS*, 106(17):6910-6915, 2009.
- UM SH, FRIGERIO F, WATANABE M, PICARD F, JOAQUIN M, STICKER M, FUMAGALLI M, ALLEGRINI PR, KOZMA SC, AUWERX J, THOMAS G. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431(7005):200-5, 2004.
- UNDENFRIEND, S, NAKAJIMA, T, PISANO, JJ. Structure of the major kinin in wasp (*Polistes*) venom. *Proc. 7th Int. cong. Biochem. VIII (4) Tokio*: 501, 1967.
- UENO, Y, HIRAI, Y, YASUHARA, T, YOSHIDA, H, NAKAJIMA, T. On the Kinin-like substances in the venom of paper wasp. *Proc. 97th Ann. Meeting Pharmaceutical Soc. Japan III*, 37, 1977.
- VAN GUNSTEREN WF, BERENDSEN HJC. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry. Weinheim, *Angew Chem Int Ed Engl* 29:992-1023, 1990.
- VAN GUNSTEREN WF, MARK AE. On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics computer simulation. Berlin, *Eur J Biochem*, 204:947-61, 1992.
- VAN GUNSTEREN WF, HÜNENBERGER PH, MARK AE, SMITH PE, TIRONI IG. Computer simulation of protein motion. Amsterdam, *Comp. Phys. Commun* 91:305-19, 1995.
- VIVANCOS GG, VERRI WA, JR., CUNHA TM, SCHIVO IR, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res* 37:391-399, 2004.
- VOLD RR, PROSSER RS, DEESE AJ. Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. *J Biomol NMR* 9(3):329-35, 1997.
- XU X, LI J, LU Q, YANG H, ZHANG Y, LAI R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. *Toxicon*, Elmsford, 47:249-253, 2006.
- WAKAMATSU K, OKADA A, MIYAZAWA T, OHYA M, HIGASHIJIMA T. Membrane-bound conformation of mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. *Biochemistry*, Washington, 31(24):5654-60, 1992.
-

-
- WALLACE MA, CARTER H R. Effects of the wasp venom peptide, mastoparan, on a phosphoinositide-specific phospholipase C purified from rabbit brain membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1006:311-316, 1989.
- WANG KR, ZHANG BZ, ZHANG W, YAN JX, LI J, WANG R. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. *Peptides* 29:963-8, 2008.
- WATANABE M, YASUHARA, T, NAKAJIMA, T. Occurrence of thr⁶-bradikinin and its analogous peptide in the venom of *Polistes Rothneyi iwatai* V. der Vecht. In: OHSAKA, A, HAYASHI, K, SAWAI, Y (eds.). *Animal, Plant and Microbial Toxins*, v. II, New York: Plenum, 105-112, 1976.
- WHEELER-JONES CPD, SAERMARK T, KAKKAR VV, AUTHI KS. Mastoparan promotes exocytosis and increases intracellular cyclic AMP in human platelets: evidence for the existence of a Ge-like mechanism. *Biochem. J.* 281:465-472, 1992.
- WIGGER E, KUHN-NENTWING L, NENTWING W. The venom optimisation hypothesis: a spider injects large venom quantities only to difficult prey types. *Toxicon*, Elmsford, 40:749-752, 2002.
- WILSON SP. Effects of mastoparan on catecholamine release from chromaffin cells. *FEBS Lett.* 247:239-241 (1989).
- WINTER CA, RISLEY EA, NUSS GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111, 544-7 (1962).
- WOJCIKIEWICZ RJH, NAHORSKI SR. Phosphoinositide hydrolysis in permeabilized SH-SY5Y human neuroblastoma cells is inhibited by mastoparan. *FEBS Lett.* 247:341-344, 1989.
- WU TM, LI ML. The cytolytic action of all-D mastoparan M on tumor cell lines. *Int J Tissue React* 21:35-42, 1999.
- YANG SN, BERGGREN PO. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27(6):621-76, 2006.
- YASUHARA T, YOSHIDA, H, NAKAJIMA, T, Chemical investigation of the hornet (*Vespa xanthoptera Cameron*) venom. The structure of a new bradikinin analogu "Vespakinin-X". *Chem Pharm Bull*, 25:935-941, 1977.
- YASUHARA T, NAKAJIMA T, ERSPAMER V. Isolation and sequence analysis of peptides in the picomolar level. In: SAKAKIBARA, S. (Ed.), *Osaka: Protein Research Foundation*, 213-218, 1983.
- YASUHARA T, MANTEL P, NAKAJIMA T, PIEK T. Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp *Megascolia flavifrons*. *Toxicon* 25(5):527-35, 1987.
- YI GB, MCCLENDON D, DESAIAH D, GODDARD J, et al. Fire ant venom alkaloid, isosolenopsin A, a potent and selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Int J Toxicol* 22:81-86, 2003.
- YOKOKAWA N, KOMATSU M, TAKEDA T, AIZAWA T, YAMADA T. Mastoparan, a wasp venom, stimulates insulin release by pancreatic islets through pertussis toxin sensitive GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 15;158(3):712-6, 1989.
- YSHII LM, SOUZA GH, CAMARGO EA, EBERLIN MN, RIBELA MT, MUSCARÁ MN, HYSLOP S, COSTA SK. Characterization of the mechanisms underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. *Toxicon* 53:42-52, 2009.
-

YU HM, WU TM, CHEN ST, HO CL, HER GR, WANG KT. Mastoparan B, synthesis and its physical and biological properties. *Biochem Mol Biol Int* 29:241-6, 1993.

ZANCHET EM, CURY Y. Peripheral tachykinin and excitatory amino acid receptors mediate hyperalgesia induced by *Phoneutria nigriventer* venom. *Eur J Pharmacol.* Apr 25;467(1-3):111-8, 2003.

ZLOTKIN, E. Insect selective toxins derived from scorpion venoms: an approach to insect neuropharmacology. *Insect Biochemistry* 13(3):219-236, 1983.
