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

O uso de um sistema LC-ESI-IT-TOF/MS e MSⁿ na prospecção de novos componentes peptídicos do veneno da vespa social *Polybia paulista*.

Nathalia Baptista Dias

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

Dezembro - 2011

NATHALIA BAPTISTA DIAS

**O USO DE UM SISTEMA LC-ESI-IT-TOF/MS E MSⁿ NA PROSPECÇÃO DE
NOVOS COMPONENTES PEPTÍDICOS DO VENENO DA VESPA SOCIAL
Polybia paulista.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO SERGIO PALMA

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

**Rio Claro
2011**

595.798 Dias, Nathalia Baptista
D541u O uso de um sistema LC-ESI-IT-TOF/MS e MSn na
prospecção de novos componentes peptídicos do veneno da
vespa social *Polybia paulista*. / Nathalia Baptista Dias. - Rio
Claro : [s.n.], 2011
121 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Vespa. 2. Peptidômica. 3. Veneno. 4. Toxinas. 5.
ESI-MS. 6. LCMS. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

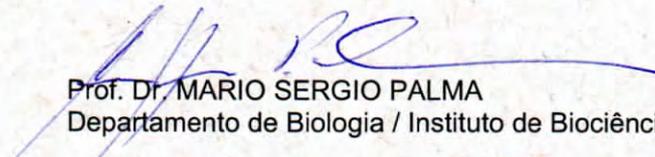
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: O uso de um sistema LC-ESI-IT-TOF/MS e MSn na prospecção de novos componentes peptídicos do veneno de vespa social *Polybia paulista*

AUTORA: NATHALIA BAPTISTA DIAS

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA

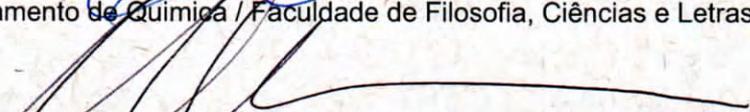
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro


Prof. Dr. LUIZ ALBERTO BERALDO DE MORAES

Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP


Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química / UNESP - Araraquara

Data da realização: 29 de fevereiro de 2012.

NATHALIA BAPTISTA DIAS

**O USO DE UM SISTEMA LC-ESI-IT-TOF/MS E MSⁿ NA PROSPECÇÃO DE
NOVOS COMPONENTES PEPTÍDICOS DO VENENO DA VESPA SOCIAL
Polybia paulista.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(área de concentração Biologia Celular
e Molecular).

Comissão Examinadora

Rio Claro, ____ de _____ de ____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Mário Sérgio Palma pela dedicada orientação, confiança e esforço fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço pelo trabalho que pude realizar e mais que tudo pela amizade construída durante estes anos de convivência.

Aos professores e funcionários do Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS) e da UNESP-Rio Claro pela amizade e ajuda para realização deste trabalho.

Ao Sr. Relator deste projeto junto à FAPESP e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Aos amigos do LBEZ, Diego, Ana Maria, Francielle, Beto, Lucy, Analy, Nicoli e Daniel, Patricia e Danilo e àqueles que não estão mais tão presentes no laboratório, Keity, Helen, Virginia, Lorenzo, Alessandra, pela grande amizade. Ao Sérgio (Sérjãooo) e Andriço pelas coletas das vespas.

Aos amigos Bibi, Bob, Luiza e Paulo pela imensa ajuda na realização de todo o trabalho e acima de tudo pela amizade de anos!

Aos meus amigos de graduação... Principalmente à Vanessa, Priscila (Rose), Michele e Felipe ... não tão perto mas sempre no coração!

À todos os meus amigos de Rio Claro!!!... Principalmente à Ana Lucia (Aninha), Mariana (Margutinha), Cris, Priscila, e André que nos últimos tempos foram companheiros inseparáveis em todos os momentos!!! À Tereza, Natalia Trento, Maria Tereza pela amizade de anos. Obrigada à todos os outros que não citei, pela ajuda nos momentos difíceis e por fazerem minha vida sempre mais divertida!!! Amo mais que chocolate !!!

Aos meus pais Maria Aparecida e Ronaldo pelo apoio, sempre presentes nas horas mais difíceis e nas mais felizes.

À minha querida irmã Camila, pelo companheirismo, amor, respeito e por todos os momentos que passamos juntas em todos esses anos!!! E a minha gatinha companheira Any ...

À toda a minha família, principalmente aos meus tios, avós e primos que sempre estão ao meu redor fazendo com que eu me sinta apoiada e amada.

À Deus por estar me dando forças para realizar meus sonhos e coragem para vencer os obstáculos.

RESUMO

O desenvolvimento dos venenos e aparelhos de ferroar entre os Insecta representa um atributo evolutivo que contribuiu para a adaptação dos insetos em muitos ambientes terrestres diferentes. Os venenos desses insetos são misturas complexas de compostos biologicamente ativos, tais como compostos de baixa massa molecular, peptídeos e proteínas. Estudos recentes têm demonstrado a capacidade de se detectar e identificar diferentes compostos de natureza peptídica, em concentrações bastante reduzidas nos venenos animais, utilizando-se diferentes abordagens de espectrometria de massas. Isso tem permitido a construção de bibliotecas peptídicas de grande interesse aplicado à biotecnologia. O veneno da vespa social *Polybia paulista* tem sido intensamente investigado, porém somente os peptídeos mais abundantes deste veneno são conhecidos: os mastoparanos Polybia -MPI e -MPIO, o peptídeo quimiotático Polybia-CP e a Paulistina. Este fato deve-se principalmente à utilização de abordagens clássicas até então, com coletas “off-line” em relação às análises de sequenciamento, fazendo com que somente os peptídeos mais abundantes pudessem ser investigados. Com os avanços na área da espectrometria de massas, incluindo o desenvolvimento da tecnologia de analisadores do tipo “ion-trap” utilizado no presente trabalho, tornou-se possível a investigação de amostras pouco abundantes, com alta velocidade de aquisição de dados e elevada resolução. O presente estudo visou a obtenção de um perfil peptídico detalhado do veneno de *P. paulista* por uma abordagem analítica moderna e mais sensível, além de padronizar o sequenciamento destes peptídeos por espectrometria de massas sequencial de maneira “on-line”. Os peptídeos foram detectados e sequenciados utilizando-se um sistema LC-ESI-IT-TOF/MS e MSⁿ de alta resolução e sensibilidade. A análise do veneno foi realizada através de cromatografia líquida de alto desempenho, sob fase reversa (HPLC), e os analitos (peptídeos) caracterizados por espectrometria de massas ESI no modo positivo, continuamente durante todo o experimento. Os componentes peptídicos do veneno de *P. paulista* estão distribuídos ao longo da faixa de massa molecular de 400-3000 Da, e em conjunto, compõem até 70% do peso seco deste veneno. As análises permitiram traçar um perfil da composição das amostras de veneno, sendo feita uma comparação destes perfis entre diferentes ninhos de *P. paulista*, e também amostras de um mesmo ninho em diferentes épocas do ano. A presente investigação revelou um nível surpreendentemente elevado de variação intraespecífica e permitiu a identificação de novos peptídeos no veneno desta espécie. Trabalhando-se

com três ninhos coletados em diferentes localizações, foi possível detectar a presença de 169 peptídeos com diferentes massas moleculares e diferentes tempos de retenção, sendo 108 peptídeos na amostra A, 92 na amostra B, e 98 peptídeos na amostra C. Quando o veneno de um mesmo ninho (amostra D) foi observado em três épocas diferentes, com intervalos de 60 dias entre cada coleta (D1, D2 e D3), foi possível detectar a presença de 94 peptídeos diferentes na amostra D1, 95 peptídeos na amostra D2, e 78 peptídeos em D3. O padrão de semelhanças e diferenças encontradas no presente trabalho pode estar relacionado ao padrão genético e reprodutivo das espécies de vespas sociais da subfamília Polybiinae, que normalmente possuem várias rainhas na mesma colônia, que podem ser irmãs ou meio-irmãs entre si, acasalando-se cada uma delas com vários machos diferentes, e suas progenias descendentes destes cruzamentos coexistem na mesma população dentro da colônia. Além de confirmar a presença dos três peptídeos já conhecidos para este veneno, novos componentes de famílias peptídicas típicas dos venenos de vespídeos tais como cininas, mastoparanos e peptídeos quimiotáticos, também foram encontrados. No total, foi possível sequenciar quatorze peptídeos, sendo três já conhecidos e onze inéditos. A estratégia analítica desenvolvida no presente trabalho permitirá sua aplicação imediata no estudo dos venenos de outras espécies animais. Três dos novos peptídeos da família das cininas foram manualmente sintetizados em fase sólida pela estratégia Fmoc, e caracterizados funcionalmente com relação à produção de dor e inflamação em mamíferos. Além disso, estes resultados demonstraram a importância da bioprospecção de produtos naturais a partir de venenos de animais, uma vez que novas moléculas podem ser encontradas e a riqueza e a diversidade desses venenos elucidada.

Palavras-chave: Peptidômica, veneno, toxinas, ESI-MS, armadilha de elétrons, LCMS.

ABSTRACT

The evolution of venoms and their injection apparatuses among the Insecta represents an evolutionary attribute which contributed for the adaptation of the insects to many different terrestrial environments. The venoms of insects are complex mixtures of biologically active compounds, such as low molecular mass compounds, peptides and proteins. Recent studies have demonstrated the ability to detect and identify different compounds in very low concentrations in animal venoms, using different approaches of mass spectrometry. This has allowed the construction of peptide libraries of great applied interest in biotechnology. The venom of the social wasp *Polybia paulista* has been intensively investigated, but only the most abundant peptides of this venom are known: the mastoparans Polybia-MPI and -MPIO, the chemotactic peptide Polybia-CP and the Paulistine. This fact is mainly due to the use of classical approaches, using off-line collections in relation to peptide sequencing, so only the more abundant peptides could be investigated. With the advances in mass spectrometry, including the development of analyzers type ion-trap as the one used in present work, it became possible to investigate low abundance samples, with high speed of data acquisition at high resolution. The objective of this study was to profile and sequence the peptide compounds present in the venom of the social wasp *P. paulista* using a modern and very sensitive analytical technique, and standardize the sequencing of peptides by high resolution LC-MS and MSⁿ strategy. Peptides were detected and sequenced using a LC-ESI-IT-TOF/MS and MSⁿ system of high resolution and sensitivity. The analysis of the venom was performed by high performance liquid chromatography on a reverse phase (HPLC), and the analytes (peptides) were characterized by ESI mass spectrometry in positive mode, continuously throughout the experiment. The peptide components from *P. paulista* venom are spread over the molar mass range 400 to 3000 Da, and together comprise up to 70% of the weight of this venom. The analysis allows drawing a profile of the venom composition of the samples, and a comparison of profiles among different nests of *P. paulista*, and also samples of the same nest in different seasons. The present investigation revealed a surprisingly high level of inter-specie variation and allowed the identification of many novel peptides in the venom of this specie. It was possible to detect the presence of 169 different peptides presenting different molecular masses and different retention times, being 108 peptides in nest A, 92 in nest B, and 98 in nest C. When the venom of same nest (Sample D) was collected in three different months of the

year, with an interval of 60 days between each collection (D1, D2 and D3), it was possible to detect the presence of 94 different peptides in sample D1, 95 in sample D2, and 78 in sample D3. The pattern of similarities and differences found in this work may occur due to the genetic and reproductive model in Polybiinae, which usually has several queens in the same colony, which can be sisters or half-sisters to each other, mating with several different males, and their progeny from these crosses descendants co-exist in the same population within the colony. Besides confirming the presence of three already known peptides from this venom, new components of typical peptides families such as kinins, mastoparanos and chemotactic peptides were also found. In total, it was possible to sequence fourteen peptides, three was already described in the venom of *P. paulista* and eleven novel ones. The analytical strategy developed in this work will allow immediate application in studies of other animal species venomous. Three of the new peptides of the kinin family were synthesized manually by solid phase (Fmoc strategy), and functionally characterized with respect to the production of pain and inflammation in mammals. Moreover, these results demonstrate the importance of bioprospecting for natural products from animal venoms, as new molecules can be found and the richness and diversity of these venoms elucidated.

Key words: Peptidomics, venom, toxins, ESI-MS, ion-trap, LCMS.

TABELA DE ABREVIÇÕES

| | | | |
|---------------|---|--------------------------|---|
| ACN | Acetonitrila | mm | Milimetro |
| BK | Bradicinina | mM | Milimolar |
| C18 | Octadecil | mmol | Milimol |
| CID | Dissociação induzida por colisão | MS/MS | Espectrometria de massas |
| CP | Peptídeo Quimiotático | ou MS² | sequencial (<i>Tandem</i>) |
| Da | Daltons | mseg | Milisegundo |
| DMF | N-N-Dimetilformamida | m/z | Relação Massa por carga |
| e/g | Equivalente/Grama | nm | Nanômetro |
| ESI-MS | Espectrometria de Massas com fonte de ionização do tipo Eletrospray | PyBOP | Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate |
| Fmoc | N-9-fluorenilmetoxicarbonil | RF | Radio frequência |
| g | Gramas | RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| h | Horas | rpm | Rotações por minuto |
| HOBt | <i>N-hydroxybenzotriazole.H₂O</i> | RP- | Cromatografia líquida de alta performance sob fase reserva |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta Performance | HPLC | |
| i.pl. | Via intraplantar | RPM | Rotações por minuto |
| IT | " <i>ion trap</i> " ou armadilha de elétrons | s | Segundos |
| kDa | Kilodaltons | SH | Solução contendo p-nitrofenil-Nacetil-β-glucosaminidina em Citrato trissódico |
| kHz | Kiloheartz | TFA | Ácido trifluoroacético |
| kV | Kilovolts | TIC | Cromatograma de íons totais |
| LBEZ | Laboratório de biologia estrutural e zooquímica | TOF | " <i>time of flight</i> " ou tempo de vôo |
| LC-MS | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas | TTC | Trifeniltetrazolium |
| LDH | Enzima lactato desidrogenase | u.m.a | Unidade de massa atômica |
| L/h | Litros por hora | V | Volts |
| M | Molar | v/v | Volume por volume |
| MALDI | " <i>Matrix-assisted laser desorption/Ionization</i> " | µm | Micrometro |
| MCM | " <i>mast cell médium</i> " | µg | Micrograma |
| MIC | Concentração inibitória mínima | µL | Microlitro |
| Min | Minuto | µM | Micromolar |
| mL | Mililitro | UV | Ultravioleta |
| | | W | Wats |
| | | % | por cento |
| | | °C | Graus Celsius |

TABELA DE AMINOÁCIDOS

| Nome (Símbolo) | Composição | Massa Média | Massa Monoisotópica | Íon Imonium |
|-----------------------------|--------------------|-------------|------------------------|-----------------------------------|
| Alanina Ala ou A | C_3H_5NO | 71,0788 | 71,03711 | 44 |
| Arginina Arg ou R | $C_6H_{12}N_4O$ | 156,1876 | 156,10111 | 129 (112, 100, 87, 73, 70, 59) |
| Asparagina Asn ou N | $C_4H_6N_2O_2$ | 114,1039 | 114,04293 | 87 (70) |
| Ácido Aspártico Asp ou D | $C_4H_5NO_3$ | 115,0886 | 115,02694 | 88 |
| Cisteína Cys ou C | C_3H_5NOS | 103,1448 | 103,00919 | 76 |
| Ácido Glutâmico Glu ou E | $C_5H_7NO_3$ | 129,1155 | 129,04259 | 102 |
| Glutamina Gln ou Q | $C_5H_8N_2O_2$ | 128,1308 | 128,05858 | 101 (84, 129) |
| Glicina Gly ou G | C_2H_3NO | 57,0520 | 57,02146 | 30 |
| Histidina His ou H | $C_6H_7N_3O$ | 137,1412 | 137,05891 | 110 (166, 138, 123, 121, 82) |
| Isoleucina Ile ou I | $C_6H_{11}NO$ | 113,1595 | 113,08406 | 86 (72) |
| Leucina Leu ou L | $C_6H_{11}NO$ | 113,1595 | 113,08406 | 86 (72) |
| Lisina Lys ou K | $C_6H_{12}N_2O$ | 128,1742 | 128,09496 | 101 (129, 112, 84, 70) |
| Metionina Met ou M | C_5H_9NOS | 131,1986 | 131,04049 | 104 (61) |
| Fenilalanina Phe ou F | C_9H_9NO | 147,1766 | 147,06841 | 120 (91) |
| Prolina Pro ou P | C_5H_7NO | 97,1167 | 97,05276 | 70 |
| Serina Ser ou S | $C_3H_5NO_2$ | 87,0782 | 87,03203 | 60 |
| Treonina Thr ou T | $C_4H_7NO_2$ | 101,1051 | 101,04768 | 74 |
| Triptofano Trp ou W | $C_{11}H_{10}N_2O$ | 186,2133 | 186,07931 | 159 |
| Tirosina Tyr ou Y | $C_9H_9NO_2$ | 163,1760 | 163,06333 | 136 |
| Valina Val ou V | C_5H_9NO | 99,1326 | 99,06841 | 72 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1. Composição dos venenos de insetos da Ordem Hymenoptera..... | 12 |
| 1.2. A riqueza peptídica em venenos animais e aplicação biotecnológica..... | 16 |
| 1.3. Peptidômica e técnicas utilizadas na prospecção de componentes peptídicos..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 21 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1. Extração do veneno..... | 22 |
| 3.2. Experimentos de LCMS-IT-TOF-MS ⁿ | 22 |
| 3.3. Síntese manual dos peptídeos em fase sólida..... | 24 |
| 3.4. Purificação dos peptídeos..... | 25 |
| 3.5. Atividade hemolítica..... | 25 |
| 3.6. Desgranulação de mastócitos..... | 26 |
| 3.6.1. Preparo das soluções..... | 26 |
| 3.6.2. Isolamento dos mastócitos..... | 27 |
| 3.6.3. Ensaio de desgranulação de mastócitos..... | 27 |
| 3.7. Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)..... | 28 |
| 3.8. Prova de sensibilidade bacteriana (MIC)..... | 29 |
| 3.9. Atividades farmacológicas relacionadas à dor e inflamação..... | 30 |
| 3.9.1. Animais..... | 30 |
| 3.9.2. Avaliação da sensibilidade dolorosa..... | 30 |
| 3.9.3. Von Frey Eletrônico..... | 30 |
| 3.9.4. Edema de pata..... | 31 |
| 3.9.5. Análise estatística..... | 31 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 32 |
| 4.1. Análise de variabilidade de composição peptídica do veneno em diferentes condições: | 33 |
| 4.1.1. Inter-ninhos (venenos de diferentes ninhos coletados na mesma época do ano) ... | 33 |
| 4.1.2. Intra-ninho (veneno do mesmo ninho em diferentes épocas do ano)..... | 41 |
| 4.2. Sequenciamento dos peptídeos encontrados nos venenos..... | 50 |
| 4.3. Resultados das atividades biológicas..... | 88 |
| 4.3.1. Hemólise..... | 90 |
| 4.3.2. Desgranulação de mastócitos..... | 91 |
| 4.3.3. Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)..... | 92 |
| 4.3.4. Antibiose..... | 93 |
| 4.3.5. Atividades Farmacológicas de Dor e Inflamação..... | 94 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.5.1. Efeito da cinina Thr6-BK sobre a sensibilidade dolorosa e sobre o efeito edematogênico | 94 |
| 4.3.5.2. Efeito da cinina RA_Thr6-BK sobre a sensibilidade dolorosa e sobre o efeito edematogênico | 96 |
| 4.3.5.3. Efeito da cinina RA_Thr6-BK_DT sobre a sensibilidade dolorosa e sobre o efeito edematogênico | 98 |
| 5. CONCLUSÃO | 103 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 105 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Composição dos venenos de insetos da Ordem Hymenoptera

As vespas sociais são conhecidas por utilizar venenos de composição complexa para própria defesa (NAKAJIMA, 1986), e também para caça (OLSON, 2000). Os compostos geralmente encontrados em venenos animais são associados com aparelhos de ferroar especializados, os quais permitem a injeção de toxinas em tecidos macios dos animais, via subcutânea, intramuscular ou rotas endovenosas (LEWIS; GARCIA, 2003). Vespas sociais frequentemente causam acidentes por ferroadas no homem, seguida de uma série de manifestações farmacológicas, inflamatórias e imunopatológicas (NAKAJIMA, 1986), sendo que a identificação química e do perfil biológico destes compostos vem atraindo a atenção de pesquisadores por décadas.

Os venenos dos insetos da ordem Hymenoptera contêm compostos de baixas massas moleculares, histamina, acetilcolina, aminas biogênicas, peptídeos farmacologicamente ativos, e proteínas (HOFFMAN, 2006). Os compostos polipeptídicos são responsáveis pelas dores prolongadas, edemas, eritema e reações alérgicas e sistêmicas (PALMA, 2006).

Peptídeos bioativos provenientes de venenos de várias espécies de vespas têm sido isolados e caracterizados (HO et al., 1998). Dentre eles, destacam-se os mastoparanos, peptídeos quimiotáticos e cininas. A silverina faz parte de um quarto grupo de peptídeos provenientes do veneno de vespas, sendo que recentemente foi descrita, uma quinta família de peptídeos encontrados nesses venenos, os quais são semelhantes às taquicininas, envolvidas na produção de inflamação neurogênica (YSHII et al., 2009). Os peptídeos encontrados nestes venenos geralmente são anfipáticos, policatiônicos e apresentam uma série de ações farmacológicas, as quais contribuem para a ocorrência de intensos processos inflamatórios (PALMA, 2006).

Mastoparanos

Os mastoparanos são tetradecapeptídeos geralmente policatiônicos, ricos em resíduos hidrofóbicos como leucina, isoleucina e alanina, apresentando algumas lisinas em suas sequências primárias, encontradas classicamente nas posições 4, 11 e 12 (NAKAJIMA et al., 1986; PALMA, 2006). Segundo Park e colaboradores (1995), os mastoparanos apresentam

várias atividades biológicas diferentes, e de acordo com seu modo de ação podem ser classificados em dois grupos:

- 1- Aqueles que promovem a lise celular através da formação de poros nas membranas celulares (ARGIOLAS; PISANO, 1983; MENDES et al., 2004b; NAKAJIMA, 1986)
- 2- Aqueles que interagem com receptores acoplados às proteínas G, conduzindo à ativação de mecanismos de desgranulação, e resultando em diferentes tipos de secreções, dependendo do tipo de célula-alvo. (HIGASHIJIMA et al., 1990; MENDES et al., 2005).

As atividades biológicas apresentadas pelos mastoparanos estão altamente relacionadas com a interação dos peptídeos com membranas biológicas (MATSUAKI et al., 1996). Foi constatado que os peptídeos ao ligarem-se às membranas fosfolipídicas, assumem a conformação em hélice anfipática (SCHWARZ; BLOCHMANN, 1993), a qual causa perturbações nas bicamadas lipídicas levando a um aumento na permeabilidade (DANILEKO et al., 1993), em alguns casos pela formação de canais iônicos (MELLOR; SANSOM, 1990).

Em 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 resíduos de 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* (CSORDÁS; MICHL, 1970).

Konno e colaboradores (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* (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.

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 ativador da fosfolipase A2 e causa liberação de histamina de mastócitos peritoneais (ARGIOLAS; PISANO, 1984b). 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; PISANO, 1984b). Ambos também causam hemólise e liberação de histamina de mastócitos peritoneais.

Embora as sequências de aminoácidos destes peptídeos sejam relativamente conservadas, substituições de alguns resíduos de aminoácidos parecem alterar as atividades biológicas destes peptídeos, demonstrando ser esta uma interessante base para estudos futuros utilizando aplicações farmacológicas (MURATA et al., 2006; CEROVSKY et al., 2008).

Peptídeos Quimiotáticos

Peptídeos quimiotáticos geralmente são tridecapeptídeos, policatiônicos, com a sequência primária apresentando algumas semelhanças em relação aos mastoparanos, como a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e amidação do resíduo C-terminal (NAKAJIMA, 1986). Estes peptídeos induzem quimiotaxia em leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (YASUHARA et al., 1983), podendo ainda causar liberação de histamina pelos mastócitos (NAKAJIMA, 1986).

Os peptídeos quimiotáticos foram inicialmente encontrados nos venenos das espécies *Vespa tropica*, *V. mandarinia*, *V. analis*, *V. crabro*, *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 *Agelaia pallipes pallipes*, *Protonectina silveirae*, *Polybia paulista*, *Vespa magnífica* e *Polistes rothneyi iwata* (BAPTISTA-SAIDEMBERG et al., 2010; DE SOUZA et al., 2005; MENDES et al., 2004a, MENDES; PALMA 2006).

Mendes e colaboradores (2004a), isolaram um peptídeo do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* caracterizado como um potente agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleados e não hemolítico; além disso, esse peptídeo possui elevada atividade antibiótica contra bactérias Gram+ e Gram-. Os peptídeos quimiotáticos isolados do veneno da vespa *V. magnífica* podem exercer amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (XU et al., 2006).

Cininas

Jaques e Schachter (1954) identificaram um peptídeo no veneno de *Paravespula vulgaris*, que devido à sua similaridade com as propriedades farmacológicas da bradicinina de

mamíferos, recebeu o nome de cinina de vespa. As cininas são peptídeos que possuem parte de suas sequências primárias homólogas às bradicininas, com algumas exceções, onde ocorre uma substituição dos resíduos de aminoácidos nas posições três e seis na sequência da bradicinina (NAKAJIMA, 1986). As cininas mostraram propriedades farmacológicas similares às das bradicininas, calidinas (Lys-bradicinina) e Met-Lys-bradicininas isoladas de mamíferos (PISANO, 1970). Quando injetadas intravenosamente, as cininas causam hipertensão em ratos, cachorros, coelhos e gatos, hipotensão em galinhas, broncoconstrição em porcos e contração em músculo liso isolado (PISANO, 1979).

As cininas são componentes neurotóxicos dos venenos de vespas e formigas, causando 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). São polipeptídeos de 9-18 resíduos de aminoácidos, contendo uma sequência típica das cininas clássicas como parte da molécula; tal sequência conservada pode ser aquela da própria bradicinina, ou da Hyp3-bradicinina, ou ainda da Thr6-bradicinina (PIEK et al., 1991).

Dois peptídeos similares às bradicininas (Protopolybiakinina-I e Protopolybiakinina-II) foram isolados do veneno da vespa social *Protopolybia exigua* por HPLC sob fase reversa e sequenciada pelo método de Química Degradativa de Edman (MENDES; PALMA, 2006). Estes dois peptídeos causaram constrição muscular e desgranulação de mastócitos, a qual foi sete vezes mais potente do que a atividade da própria bradicinina (MENDES; PALMA, 2006).

Pisano (1970) demonstrou que a polistescinina-3 chega a ser de duas a vinte vezes mais potente que a bradicinina em muitos bioensaios. Além disso, Johnson e Erdos (1973) mostraram que em uma concentração de 3×10^{-7} M desta cinina, causa liberação de histamina de mastócitos de ratos com uma potência dez vezes maior que a bradicinina nesta mesma concentração.

Silverinas

A silverina faz parte do quarto grupo de peptídeos policatiônicos anfipáticos provenientes do veneno de vespas. Este peptídeo contém 21 a 25 resíduos de aminoácidos, apresentando uma única ponte dissulfeto. Estes peptídeos são potentes desgranuladores de mastócitos, porém não apresentam atividade hemolítica conhecida (PALMA, 2006).

Dohtsu e colaboradores (1993) isolaram do veneno da vespa *Protonectarina sylveirae*, um peptídeo chamado silverina que não apresentou homologia de sua sequência primária com nenhuma classe de peptídeo anteriormente caracterizada. Nos últimos anos, também foram

encontrados outros peptídeos deste tipo nos venenos das vespas *Agelaia pallipes pallipes* (Pallipina) (COSTA, 1996), *Protopolybia exigua* (Exiguina) (DOHTSU et al., 1993) e *Synoeca cyanea* (Cyanina) (DOHTSU et al., 1993).

Baptista-Saidemberg (2010) isolou três peptídeos, Pallipina-I, Pallipina-II e Pallipina-III similares ao peptídeo Silverina (DOHTSU et al., 1993) no que diz respeito a sequência de aminoácidos. 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 (BAPTISTA-SAIDEMBERG, 2010).

Taquicininas

As taquicininas compõem uma família de peptídeos que possuem uma sequência C-terminal do tipo: Fe-X-Gli-Leu-Met-NH₂. Esta família foi assim denominada por produzir rápida contração de vísceras animais, em oposição à bradicinina, que provoca contração intestinal de ação lenta (KALIL-GASPAR, 2003). Análises de espectrometria de massas do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio*, revelaram a presença de dois peptídeos (QPPTPEHRFPGLM e ASEPTALGLPRIFPGLM) com sequências similares à região C-terminal dos peptídeos semelhantes à taquicininas encontradas no veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* e em vertebrados (YSHII et al., 2009).

1.2. A riqueza peptídica em venenos animais e aplicação biotecnológica

A riqueza em componentes peptídicos presentes nos venenos é uma questão intrigante e um grande desafio para a pesquisa, especialmente quando alguns destes peptídeos se constituem em modelos estruturais para o desenvolvimento de novos fármacos. Numerosos estudos, produzidos nos últimos 30 anos, vêm elucidando estruturas e atividades biológicas de vários componentes dos venenos animais, demonstrando a complexa composição destes venenos (ESCOUBAS et al., 2008). A descoberta de compostos em venenos, que apresentam atividades seletivas contra receptores celulares bem definidos, representa um exemplo de aproximação desta linha de pesquisa com a busca de novas drogas (LEWIS; GARCIA, 2003).

Em 1970 a droga antihipertensiva captopril foi desenvolvida a partir de um peptídeo isolado da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (CUSHMAN; ONDETTI, 1991). Mais recentemente, outras drogas foram produzidas a partir de moléculas isoladas de venenos animais: a ω -conotoxina MVIIA (Ziconitide, Prialt[®]), um peptídeo de 25 resíduos isolado do veneno de *Conus magus* foi aprovada em 2004 como um analgésico para o tratamento da dor crônica (MILJANICH, 2004), enquanto o exenatide (Byetta[®]), um peptídeo de 39 resíduos isolado da saliva do lagarto (*Heloderma suspectum*) foi aprovado em 2005 para o tratamento de diabetes tipo II (MALONE et al., 2009).

Os peptídeos antimicrobianos vêm atraindo muita atenção como uma nova classe de antibióticos, especialmente contra patógenos antibiótico-resistentes (ZASLOFF, 2002). Como é uma rica fonte de componentes bioativos, os venenos de vespas vêm demonstrando ser um excelente material para a busca de novos agentes antimicrobianos (CHEN et al., 2008). Foram isolados três peptídeos antibióticos a partir da geléia real de *Apis mellifera* (FONTANA et al., 2004). Esses peptídeos se destacaram principalmente pela atividade antibiótica tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas.

Mendes e colaboradores (2004a), isolaram dois novos peptídeos do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, nomeados Protonectina (ILGTILGLLKGL-NH₂) e Agelaia-MP (INWLKLGKAIIDAL-NH₂). A Protonectina foi caracterizada como um potente agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleados e não hemolítico; além disso, esse peptídeo possui elevada atividade antibiótica contra bactérias Gram+ e Gram-. Já o peptídeo Agelaia-MP mostrou uma potente atividade hemolítica e desgranuladora de mastócitos peritoneais, porém uma baixa atividade antibiótica e nenhuma atividade quimiotática (MENDES et al., 2004a).

Outro peptídeo antibiótico foi isolado à partir do veneno da vespa social *Polybia paulista*, este peptídeo é pertencente à classe dos mastoparanos e foi denominado Polybia-MP-I, também apresentou atividades hemolítica, desgranuladora de mastócitos e quimiotática para leucócitos polimorfonucleares (DE SOUZA et al., 2005). Wang e colaboradores (2008) estudaram a eficácia anti-tumoral e a seletividade celular para este peptídeo. O estudo revelou que Polybia-MPI exerce eficácia citotóxica e anti-proliferativa por formação de poro, podendo inibir seletivamente a proliferação de células de câncer de próstata e bexiga, mas apresentando menor citotoxicidade à fibroblastos normais de camundongos (WANG et al., 2008).

Foram isolados também do veneno de *P. paulista*, outros dois peptídeos, com o resíduo N-terminal bloqueado por uma acetilação, com atividade antibiótica, denominados Polybina-I e -II (RIBEIRO et al., 2004).

Um composto com atividade antinociceptiva do veneno da vespa social *Polybia occidentalis* foi isolado, sendo que o peptídeo isolado e identificado pertence à classe das neurocininas, anteriormente descrito em outras vespas como sendo uma Thr6-Bradicinina (MORTARI et al., 2006). A primeira descrição dessa molécula foi no veneno da vespa social *Polistes rothneyi iwatai*, há 30 anos (WATANABE et al., 1976), e, mais tarde, no veneno da vespa solitária *Megascolia flavifrons* (YASUHARA et al., 1987).

Muitas neurotoxinas de artrópodes têm sido isoladas e caracterizadas. No sistema nervoso central, essas moléculas podem atuar em diferentes alvos neuronais, como: receptores, transportadores de canais iônicos em ambas as neurotransmissões excitatórias e inibitórias (BELEBONI et al., 2004; MELLOR ; USHERWOOD , 2004). Assim, essas neurotoxinas têm sido extremamente úteis tanto como ferramentas farmacológicas, quanto na prospecção de novos fármacos para o tratamento de distúrbios neurológicos, como a epilepsia e a isquemia, e para o controle da dor (SHEN et al., 2000; WANG; CHIN, 2004).

1.3. Peptidômica e técnicas utilizadas na prospecção de componentes peptídicos

Devido às suas propriedades físico-químicas, os peptídeos podem ser diretamente analisados através de espectrometria de massas. Estes estudos são também chamados de peptidômica, sendo o modelo experimental e instrumentação revisados em Boonen e colaboradores. (2008). 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).

Desde o ano de 1980 (HUNT et al., 1986; BIEMANN; SCOBLE, 1987), a espectrometria de massas vem sendo utilizada para investigação estrutural de peptídeos e proteínas. A espectrometria de massas tornou-se desde então uma importante ferramenta nos laboratórios de bioquímica e biologia molecular.

Novas técnicas cromatográficas para separação de peptídeos estão constantemente sendo desenvolvidas, com grande aumento na sensibilidade, resolução e alcance dinâmico, baseadas em tecnologias nano, chip e UPLC. Combinadas com espectrômetros de massas de

alta resolução (como o utilizado no presente trabalho), estas técnicas se tornarão muito úteis para o futuro da venômica (DE GRAAF et al., 2009).

Espectrômetros de massa híbridos, combinando diferentes tipos de analisadores massas, como por exemplo “Quadrupolo-Time-Of-Flight” (Q-TOF) têm sido utilizados cada vez mais em um grande número de aplicações, devido à velocidade de aquisição de dados, precisão de alta massa, poder de resolução, e alta sensibilidade (STEEN et al., 2001). A incorporação de analisadores do tipo “*ion-trap*” (ou a armadilha de íons) (IT) com TOF (IT-TOF) levou não só a um aumento no poder de resolução, mas também permitiu experimentos de espectrometria sequencial de alta performance, uma vez que o sistema IT é capaz de análises MSⁿ. Enquanto instrumentos com analisadores TOF exibem um poder de resolução de massa superior a 10.00, e precisão de massa menor que 5 ppm, um equipamento híbrido IT-TOF representa uma plataforma atraente para aplicações bioanalíticas (DODONOV et al., 2000). As vantagens das técnicas de MSⁿ com respeito a velocidade, sensibilidade e aplicabilidade em misturas peptídicas complexas, gradualmente têm levado a substituição de técnicas como Edman por técnicas de LC-MS/MS (SEIDLER et al., 2010).

A combinação de técnicas, como a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) e Espectrometria de Massas tem sido determinante para a revelação de muitos componentes dos venenos animais (KRISHNAMURTHY et al., 1996; ESCOUBAS et al., 2008). A combinação destas técnicas possibilitam a separação e identificação de componentes peptídicos que se encontram em reduzidas quantidades na amostra a ser estudada, revelando cada vez mais novos componentes. Por exemplo, estudos envolvendo venenos de aranhas do gênero *Brachypelma* por HPLC e MALDI-TOF/MS revelaram a presença de 40-50 componentes peptídicos diferentes no veneno bruto, dependendo da espécie (ESCOUBAS et al., 1997). Outros exemplos incluem o estudo de modificações N- e C- terminais em toxinas presentes no veneno da aranha do gênero *Phoneutria* por MALDI-TOF MS, e LC-MS/MS, mostrando heterogeneidade e a presença de múltiplas isoformas peptídicas no veneno (PIMENTA et al., 2005).

Trabalhos de proteômica e peptidômica utilizando-se de técnicas avançadas como LC-ESI-MS e nano ESI-MS/MS permitem a identificação rápida e sensível e a caracterização de proteínas e peptídeos com grande eficiência. Venenos de serpentes são conhecidos por conterem cerca de 100 componentes peptídicos diferentes (CALVETE et al., 2007), enquanto venenos de escorpiões, aranhas e moluscos marinhos do gênero *Conus* têm demonstrado conterem de 300 à 1000 componentes diferentes (PIMENTA et al. 2001; ESCOUBAS et al.. 2006; NEWTON et al., 2007; BIASS et al., 2009; DAVIS et al., 2009).

Até hoje, a maioria dos peptídeos isolados dos venenos de Hymenoptera têm sido isolados e caracterizados estruturalmente com a utilização de protocolos analíticos convencionais, onde classicamente se fraciona os venenos por cromatografia de fase reversa, onde as frações são coletadas, concentradas e analisadas “*off-line*” por espectrometria de massas e Química Degradativa de Edman (MENDES et al., 2004a, 2004b, 2005, 2006; DE SOUZA et al., 2005, 2009). Utilizando-se da combinação do o fracionamento “*off-line*”, combinado com análises ESI-IT-TOF/MS e MSⁿ Baptista-Saidemberg e colaboradores (2010) detectaram e sequenciaram nove novos peptídeos no veneno da vespa social neotropical *Agelaia pallipes pallipes*.

As abordagens experimentais convencionais, como por exemplo, o uso de técnicas de fracionamento em larga escala, com coletas de frações “*off-line*”, se concentram apenas nos componentes mais abundantes, não considerando a presença dos componentes minoritários. Assim, trabalhos de proteômica e peptidômica utilizando-se de técnicas avançadas como LC-ESI-MS e nano ESI-MS/MS permitem identificações rápidas, utilizando-se pequenas quantidades de amostra. Por exemplo, um estudo proteômico por LC-ESI-MS “*on-line*” revelou mais de 85 massas moleculares diferentes no veneno bruto de *Apis mellifera* (STOCKLIN; FAVREAU, 2002). Recentemente, o veneno da abelha solitária *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae) foi analisado pelo método “*on-line*” LC-ESI-MS e nanoESI-MS, sendo que mais de 50 componentes diferentes foram encontrados, com massas moleculares variando de 400 a 4000 Da (STOCKLIN et al., 2009).

Trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório (LBEZ) possibilitaram a identificação de vários peptídeos presentes em venenos de vespas sociais, porém muitos dos peptídeos menos abundantes não puderam ser estudados com as técnicas utilizadas nestes trabalhos (MENDES et al. 2004a e b, 2005; DE SOUZA et al., 2004; DE SOUZA, 2006). Os protocolos de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas em micro-escala desenvolvidas no presente trabalho permitiram a padronização de técnicas de fracionamento, associadas ao sequenciamento de compostos peptídicos pouco abundantes nos venenos de vespas por espectrometria de massas. Estas técnicas utilizam menores quantidades de material biológico, em menor tempo de aquisição de dados, e utilizando-se de quantidades muito menores de fase móvel.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve sua inspiração em um dos objetivos maiores do programa BIOprospecTA/FAPESP, voltado a bioprospecção de novos compostos naturais de espécies autóctones da fauna do Estado de São Paulo. Assim, foi proposto o desenvolvimento de uma plataforma analítica que permitisse a detecção, identificação e caracterização de peptídeos presentes nos venenos de vespas sociais. Como modelo biológico de estudo foi escolhida a vespa *Polybia paulista*.

Este trabalho teve como objetivos:

- Padronizar técnicas de separação e sequenciamento de novos peptídeos presentes no veneno da vespa social *P. paulista*, presentes em menores quantidades diminutas, ou ainda componentes mais abundantes ainda não descritos em literatura, através da utilização do sistema UFLC (SHIMADZU) acoplado diretamente ao Espectrômetro de Massas do tipo IT-TOF/MS e MSⁿ;

- Comparar os perfis peptídicos do veneno de diferentes ninhos da mesma espécie de vespa e acompanhar as diferenças de composição peptídica do veneno de um mesmo ninho, em diferentes períodos do ano;

- Investigar a ação hemolítica, desgranuladora de mastócitos, antibiótica, edematogênica e hipernociceptiva de alguns dos novos peptídeos encontrados no veneno;

- Sob o ponto de vista de formação de recursos humanos, este trabalho teve por objetivo a formação de recursos humanos altamente qualificados em técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho, espectrometrias de massas, síntese de peptídeos, e análise de atividades biológicas, que também se enquadram dentro dos objetivos maiores do programa BIOprospecTA/FAPESP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extração do veneno

Três ninhos da vespa social *P. paulista* foram coletados e georreferenciados no município de Rio Claro (SP) em localidades próximas: Ninho/Amostra **A** (22°23'43.0''S, 047°32'32,8''W), Ninho/Amostra **B** (22°23'43.2''S, 047°32'33,6''W) e Ninho/Amostra **C** (22°23'43.0''S, 047°32'35,3''W) para observação das variações de composição peptídica dos venenos comparados inter-ninhos.

Além disso, vespas de outro ninho, nomeado Amostra **D** (22°23'43.0''S, 047°32'38,3''W) foram coletadas três vezes com intervalos de 60 dias entre as coletas, para observação de variações de composição peptídica do veneno comparado intra-ninho.

Os reservatórios de veneno de 30 operárias da espécie *P. paulista* (Hymenoptera, Vespidae) foram extraídos manualmente de cada um dos ninhos com auxílio de pinças de ponta fina, e nomeadas como amostra **A**, **B**, **C**, e **D1**, **D2**, **D3** seguindo a denominação dos ninhos e épocas de coleta. Depois de extraídos, os reservatórios foram comprimidos com auxílio de um bastão de vidro, com ponta arredondada. Em seguida, este material foi centrifugado em uma micro-centrífuga de alta rotação MSE (SANYO) a 8000 rpm por 10 minutos, em presença de solução de acetonitrila (ACN) (MALLINCKRODT) 50% (v/v) em água. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. O sobrenadante foi filtrado em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida, liofilizado em liofilizador (HETO, modelo MLW – LGA 05) acoplado a um concentrador de amostras à vácuo (HETO) e mantido à -20° C até a utilização.

3.2. Experimentos de LCMS-IT-TOF-MSⁿ

As amostras da fração peptídica (40 µg cada) extraídas do veneno bruto foram analisadas por espectrometria de massas com a utilização de um sistema LCMS-IT-TOF, tanto para detecção de novos compostos peptídicos, quanto para o sequenciamento dos mesmos. Foi utilizado o sistema UFLC (SHIMADZU) contendo duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20A_{HT} e forno para coluna CTO-20A, acoplado diretamente (“*on-line*”) ao espectrômetro de massas. As análises cromatográficas foram realizadas sob gradiente de ACN de 5 a 90% (v/v), contendo 0,05% (v/v) de TFA por 90 min., utilizando-se uma coluna XBrigdeTM BEH300 C18 (2,1x100mm;

3,5 μm) (WATERS). A eluição dos componentes foi monitorada por absorvância ultravioleta a 214 nm, com fluxo de 0,2 mL/min.

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização “*electrospray*” (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas “*ion-trap*” e “*Time-of-Flight*” (IT-TOF) (SHIMADZU). As análises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, durante todo o experimento. O software *LCMS solution* (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200° C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15000.

Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação peptídica em condições de *decomposição induzida por colisão* (CID) (MS^2) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS^1 . Foi utilizado argônio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados durante 50 msec no “*ion trap*”, utilizando-se energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz, para os íons moleculares de carga +2 ($[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$), + 3 ($[\text{M}+3\text{H}]^{+3}$) e assim sucessivamente.

Os espectros de massas obtidos foram analisados primeiramente com as ferramentas do software *LCMS solution* (SHIMADZU), utilizado para controle de aquisição e análise de dados. A rotina descrita por Cantú e colaboradores (2008) foi utilizada para a interpretação dos espectros de massas obtidos. Os espectros contendo íons multiprotonados foram convertidos para a forma numérica com auxílio da função *Mass Table* do software *LCMS solution*, e então manualmente deconvoluídos para espectros contendo apenas íons monoprotonados, com o objetivo de simplificar a interpretação de tais espectros, possibilitando o assinalamento das sequências primárias dos peptídeos. Os cálculos realizados para a obtenção das sequências foram feitos utilizando uma tolerância de massa de 0,1 u.m.a. A distinção entre os resíduos isobáricos Leucina (L) e Isoleucina (I) foi resolvida em alguns casos através da utilização de íons das séries *d* e *w*.

3.3. Síntese manual dos peptídeos em fase sólida

A síntese dos peptídeos lineares (Tabela 1) utilizados para os bioensaios foi realizada manualmente, através do método de síntese em fase sólida (MERRIFIELD, 1986), utilizando-se N-9-fluorenilmetoxycarbonil, também conhecida como estratégia Fmoc.

TABELA 1: Sequências dos peptídeos identificados no veneno de *P.paulista* e sintetizados.

| <u>NOME</u> | <u>SEQUENCIA</u> |
|---------------|---|
| Thr6-BK | R P P G F T P F R _{OH} |
| RA_Thr6-BK | R A R P P G F T P F R _{OH} |
| RA_Thr6-BK_DT | R A R P P G F T P F R D T _{OH} |

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se 100 mg de resina NovaSyn TGR, com grau de substituição de 0,2 mmol e/g. 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-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfínio (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). A retirada do Fmoc foi realizada utilizando-se Piperidina (FLUKA) 30% (v/v) em DMF.

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 a 4° C (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH). O material sedimentado foi então re-suspendido em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada MilliQ Advantage A10 (MILLIPORE) para então ser purificado através de cromatografia

líquida. O controle de qualidade foi feito por espectrometria de massas (ESI-MS). O rendimento da síntese de cada peptídeo foi de aproximadamente 30%.

3.4. Purificação dos peptídeos

A purificação dos peptídeos provenientes da síntese manual foi feita através de cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC, *Reversed-phase High Performance Liquid chromatography*) utilizando um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-8A, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-20A, constituído por duas bombas LC-8A (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com “loop” de 2 mL, um sistema controlador Shimadzu (modelo SCL 10Avp) e coluna preparativa Shimpack C-18 PREP-ODS(K) 30 x 250 mm (SHIMADZU). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, sendo **A**: água, contendo 0,1% TFA (v/v); e **B**: ACN (MALLINCKRODT) contendo 0,1% TFA (v/v). O fluxo do solvente para todos os peptídeos foi de 10mL/min. Para todos os peptídeos foi utilizada uma eluição isocrática com fase móvel constituída de 20% B.

As frações coletadas, correspondendo ao pico de absorbância, foram reunidas e parcialmente evaporadas em equipamento Rotavapor, sendo que o material restante foi seco em Speed-vac e pesado.

3.5. Atividade hemolítica

Os experimentos de atividade hemolítica foram realizados segundo metodologia descrita por De Souza (2006), com algumas modificações e número de repetições de n=5.

Foram adicionados cerca de 500 µL de sangue extraído da cauda de ratos Wistars fêmeas em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85%, CaCl₂ 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. 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. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 4% diluindo-se a suspensão concentrada descrita

acima, com solução salina isotônica. Essa suspensão a 4% 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. A cada orifício foram adicionados 90 μL da suspensão de eritrócitos perfazendo um volume final de 100 μL . Para o controle de 0% de hemólise foram adicionados 10 μL de solução salina a 90 μL da suspensão de eritrócitos; para o controle de 100% de hemólise, foram adicionados apenas 10 μL de solução salina acrescida de 1% (v/v) de Triton X-100 (SIGMA) a 90 μL de suspensão de eritrócitos.

Cada placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas sob agitação. Após este 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 (Biotrak II - AMERSHAM BIOSCIENCE, modelo), com filtro de 540 nm.

3.6. Desgranulação de mastócitos

Os testes de desgranulação de mastócitos foram feitos segundo metodologia de Hide e colaboradores. (1993) com algumas modificações e número de repetições de $n=5$. Foram testados os três peptídeos nas concentrações variando de 3×10^{-4} a 5×10^{-1} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em triplicata e utilizou-se o peptídeo HR1 como peptídeo padrão para desgranulação (TUICHIBAEV et al., 1988), também nas mesmas concentrações.

3.6.1. Preparo das soluções

Foram preparadas as seguintes soluções para a realização dos testes de desgranulação de mastócitos:

Solução MCM-1 (*mast cell medium*)

Para 100 mL de solução MCM-1, foram colocados 0,877 g de NaCl (MERCK), 0,028 g de KCl (MERCK), 0,043 g de NaH_2PO_4 (SYNTH), 0,048 g de KH_2PO_4 (SYNTH), 0,10 g de glicose (SYNTH), 0,10 g de BSA (SIGMA), 90 μL de CaCl_2 (1M) (VETEC) e 100 mL água mili Q.

Solução MCM-2

Para a solução MCM-2 utilizou-se 100 mL de MCM-1 e 50 µL de Liquemine (Heparina Sódica 5000 UI/0, ROCHE).

Solução SH

Dissolveu-se 0,588 g de Citrato trissódico (MERCK) em 10 mL de água bidestilada. O pH foi ajustado para 4,5 com solução de HCl (1M) (SYNTH). A 10 mL desta solução de citrato trissódico (pH 4,5), foram adicionados 0,0034 g de p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminidina (SIGMA).

3.6.2. Isolamento dos mastócitos

Os ratos Wistar fêmeas foram anestesiados com 300 µL de solução 1/1 dos anestésicos Quetamina e Xilasina, aplicado via subcutânea, e em seguida decapitados para retirada do sangue. Foi feito um corte longitudinal no abdômen para expor a cavidade peritoneal. Os órgãos foram afastados e fez-se a lavagem desta cavidade com 20 mL de solução MCM-2, para se extrair o fluido contendo os mastócitos em suspensão. Este fluido foi coletado com auxílio de uma seringa e armazenado em banho de gelo. Repetiu-se este procedimento por três vezes.

O fluido peritoneal foi centrifugado à velocidade de 100 g por 5 min, a 4° C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento de células foi ressuspenso em 2 mL de MCM-1 e centrifugado novamente sob as mesmas condições. O sobrenadante foi novamente retirado e ressuspenso em 2 mL de MCM-1. Esta suspensão de células foi utilizada para o ensaio de desgranulação de mastócitos.

Foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer com auxílio de uma solução corante 0,05% (v/v) de cristal violeta em HCl (3,6 M). Ajustou-se a concentração para $4,5 \times 10^5$ células/mL.

3.6.3. Ensaio de desgranulação de mastócitos

Preparou-se microplacas (COSTAR) colocando-se 90 µL da suspensão de mastócitos e 10 µL das soluções com diferentes concentrações de cada peptídeo. Para o valor de referência “zero%” de desgranulação foram adicionados 10 µL de água bidestilada e 90 µL da suspensão

de mastócitos, para que a diluição do fluido peritoneal fosse a mesma em toda a placa. Para o valor de referência “100%” de desgranulação adicionou-se 10 μL de água bidestilada contendo Triton X-100 1% (v/v) e 90 μL da suspensão de mastócitos.

Esta microplaca foi incubada por 15 min a 37° C em banho-maria para que houvesse o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Passado esse tempo, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado a 1000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante removido e utilizado na sequência das análises.

Com os sobrenadantes, montou-se uma nova placa, com cada orifício contendo 50 μL de sobrenadante e 50 μL de SH. Esta placa foi incubada por 6 horas, a 37° C.

Após a incubação, descartou-se 50 μL de cada orifício e acrescentou-se 150 μL de solução Tris 0,2 M (SIGMA). A medida de desgranulação foi feita através da leitura de absorbância a 405 nm, em leitora de placas (Biotrak II – AMERSHAM BIOSCIENCE).

3.7. Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

Essa atividade mede a liberação da lactato desidrogenase dos mastócitos, para o meio extracelular, como indicador de lise dos mastócitos pelo peptídeo. A LDH é uma enzima citoplasmática, que catalisa a redução reversível do piruvato a lactato, utilizando NADH como coenzima. A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos extraídos da cavidade peritoneal de ratos Wistar, como descrito para os ensaios de desgranulação e número de repetições de n=5. Incubou-se 20 μL do sobrenadante da suspensão de mastócitos com 800 μL de tampão UV-LDH [Reagente 1 (TRIS 50 mM pH 7,4, ácido pirúvico 1,2 mM, EDTA 5 mM) 80% (v/v). Reagente 2 (NADH 0,18 mM) 20% (v/v)] por 5 minutos a 25°C. Após esse período, a cinética de consumo do substrato NADH foi monitorada pela medida do decréscimo da absorbância a 340 nm, durante 10 minutos a 25°C. Os resultados foram inicialmente calculados como unidades catalíticas (micromols de NADH consumidos por min. a 25°C, pH 7,4). Esses valores foram convertidos em atividade relativa, através da atividade de LDH total (100%) da suspensão de mastócitos lisados, na presença de Triton X-100 0,1% (v/v).

3.8. Prova de sensibilidade bacteriana (MIC)

Os testes para verificação de atividade antimicrobiana dos peptídeos foram realizados através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Os experimentos foram montados em micro-placas de 96 canais e a visualização dos resultados foi feita utilizando-se o cromóforo cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (MALLINCKRODT), segundo metodologia descrita por Coyle e colaboradores. (2003) e Meletiadis e colaboradores (2000).

Os peptídeos foram testados contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Escherichia coli* (ATCC 1175), obtidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais – C.E.I.S. (IBRC/UNESP). Foram utilizados: meio de cultivo Müller-Hinton (DIFCO), meio de cultivo Müller-Hinton Broth (DIFCO) para manutenção e cultivo desses microrganismos. Toda a manipulação dos microrganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE) e todo material utilizado no cultivo foi esterilizado em autoclave vertical AV30 (PHOENIX), por 20 minutos à 121° C e 1 atm.

Para a realização do experimento, os inóculos foram preparados em solução salina (NaCl 0,9%) à partir de colônias novas (colônias de 18 horas). A concentração desses inóculos foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland. Foram adicionados 200 µL de inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, sendo essa suspensão utilizada para a montagem das micro-placas.

Em cada orifício da placa foram colocados 10 µL de solução de peptídeo (diluído em água esterilizada em diferentes concentrações), 10 µL da suspensão de inóculo e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido.

Para o valor de referência zero, foram colocados 80 µL de meio Müller-Hinton líquido, 10 µL de água bidestilada esterilizada e 10 µL de salina. Para o valor de referência 100%, foram colocados 10 µL de água e 10 µL da suspensão de inóculo e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido. Foi montada uma placa para cada espécie de microrganismo mencionado acima. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34° C, por 18 horas. Após este período, acrescentou-se a cada orifício 10 µL de TTC 0,5% (m/v) em água. As leituras foram realizadas após 3 horas de re-incubação das placas em estufa a 34° C.

3.9. Atividades farmacológicas relacionadas à dor e inflamação

3.9.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 18-21g fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Centro de Estudos de Insetos Sociais da Unesp Campus de Rio Claro-SP. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada com temperatura ambiente de $20 \pm 3^\circ \text{C}$ e ciclo claro/escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (CEUAIB, Protocolo número: 567/09) e obedeceram às normas propostas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983).

3.9.2. Avaliação da sensibilidade dolorosa.

Os animais foram submetidos, para avaliação da sensibilidade dolorosa, ao teste do von Frey eletrônico. Foi determinado, a partir desse teste, se as cininas testadas apresentavam efeito hiperalgésico ou analgésico. Como controle positivo foi utilizado a carragenina. Para avaliação do efeito inflamatório ou anti-inflamatório das cininas foi utilizado um paquímetro digital (CD-6 CSX-B-MITUTOYO SUL AMERICANA LTDA) Estes testes foram realizados em diversos tempos sendo que cininas (cinina Thr6-BK; cinina RA_Thr6-BK e cinina RA_Thr6-BK_DT) testadas foram administradas por via intraplantar.

3.9.3. Von Frey Eletrônico

Os animais 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 lambere 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 subsequentes, de tal forma que a variação entre as medidas não fossem maiores que 1 g. Os animais foram submetidos ao von Frey em diversos tempos após a administração, por via intraplantar, das cininas, carragenina (controle positivo) e salina (controle negativo).

3.9.4. Edema de pata

Foi avaliado o efeito edematogênico das cininas. Os animais receberam uma aplicação intraplantar (em uma das patas) de cininas, carragenina 1%, ou veículos (controles). O volume da pata foram realizadas nos tempos zero (imediatamente após as injeções das cininas ou carragenina) e em diversos tempos após a injeção do agente flogístico 99, utilizando um Paquímetro digital de especificação 0-150X0,01 mm (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 as cininas).

3.9.5. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm SEM. Os dados referentes aos tratamentos foram estatisticamente examinados utilizando ANOVA de duas vias, seguida por meio de análise de variância associada ao teste de Tukey ($p < 0,05$) (KLEINBAUM et al., 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em três partes:

PARTE I:

4.1 Análise de variabilidade de composição peptídica do veneno em diferentes condições:

4.1.1. Inter-ninho (venenos de diferentes ninhos coletados na mesma época do ano)

4.1.2. Intra-ninho (veneno do mesmo ninho em diferentes épocas do ano)

PARTE II:

4.2. Sequenciamento de alguns peptídeos encontrados no veneno.

PARTE III:

4.3. Atividades biológicas dos peptídeos sintetizados da família das cininas,

PARTE I:

4.1. Análise de variabilidade de composição peptídica do veneno em diferentes condições:

4.1.1. Inter-ninhos (venenos de diferentes ninhos coletados na mesma época do ano)

Inicialmente neste trabalho, foram realizados vários experimentos para verificar as melhores condições cromatográficas, para se fazer uma varredura cromatográfica ampla dos peptídeos presentes na porção peptídica do veneno de *P. paulista*, sendo que o gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) durante 90 minutos foi o que apresentou melhor separação cromatográfica, tanto no cromatograma UV quanto no cromatograma de íons totais (“*Total Ion Chromatogram*” = *TIC*). Além disso, a boa qualidade dos cromatogramas foi fundamental para que as análises de amostras diferentes pudessem ser comparadas entre si, principalmente para estabelecer as frações cromatográficas características do veneno e as diferenças entre as amostras.

Foi desenvolvido um “cromatograma controle” (branco), nas mesmas condições da amostra, onde se injetou apenas o solvente das amostras. Em paralelo a porção peptídica do veneno foi injetada, onde foram otimizadas as condições de ionização, “aprisionamento” dos íons formados (*trapping*) e de otimização das condições de dissociação induzida por colisão (*CID*) em baixas energias, de maneira a se conseguir séries completas de íon-fragmentos dos tipos *b* e/ou *y*, a fim de facilitar o sequenciamento dos peptídeos sob investigação.

Primeiramente, foram analisados os cromatogramas UV (com leitura de absorvância em 214nm) de três diferentes amostras. Estas três amostras correspondem às porções peptídicas dos venenos das vespas (20 µg/amostra) extraídos na presença de ACN 50% (v/v), coletados de três ninhos diferentes encontrados em regiões próximas na cidade de Rio Claro, SP, sendo denominadas por Amostra “A”, “B” e “C”. Os cromatogramas UV estão representados nas figuras de 1 a 3, para as amostras A, B e C, respectivamente.

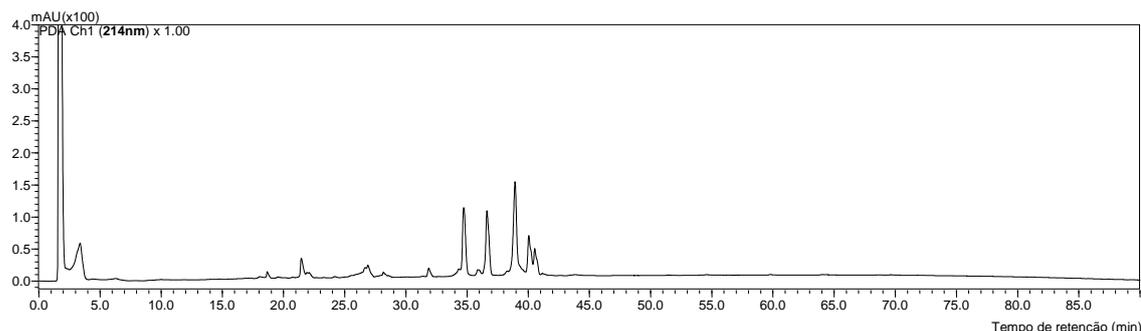


Figura 1: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra **A** de veneno de *P. paulista* (20 μg), obtido em coluna XBrigde™ BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.

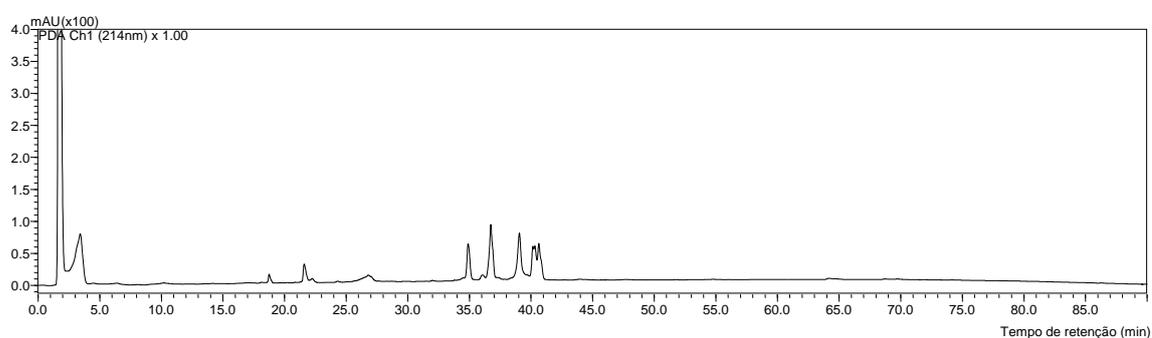


Figura 2: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra **B** de veneno de *P. paulista* (20 μg), obtido em coluna XBrigde™ BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.

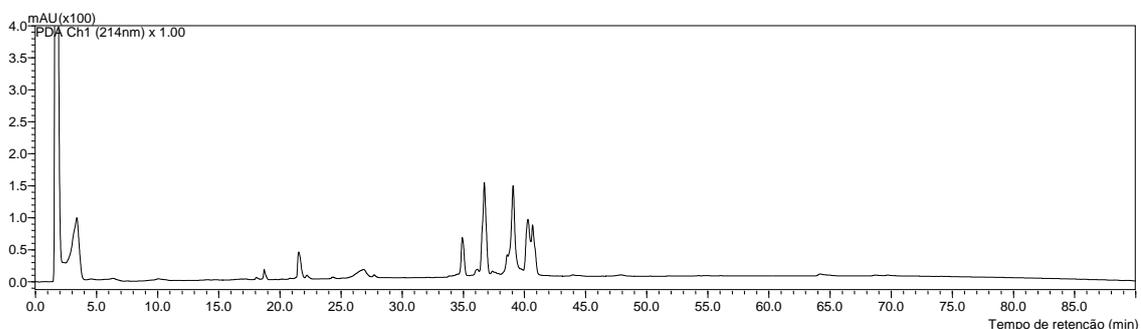


Figura 3: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra **C** de veneno de *P. paulista* (20 μg), obtido em coluna XBrigde™ BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.

Os cromatogramas UV (214 nm) são muito semelhantes quando comparados entre si, sendo difícil perceber as diferenças entre as amostras provenientes de diferentes ninhos, coletados em diferentes localidades. Assim, os Cromatogramas de Íons Totais (*TIC*) dos experimentos realizados com as três amostras, foram utilizados como parâmetro para a análise quantitativa e qualitativa dos peptídeos, uma vez que este formato apresenta maior sensibilidade, podendo detectar pequenas quantidades de compostos e diferenças sutis entre as amostras, quando comparada ao cromatograma UV.

Para a realização das análises das diferentes massas moleculares presentes nas diferentes amostras, os cromatogramas de massas foram analisados minuto a minuto (considerado como uma janela analítica individual) a fim de se estabelecer quais as massas presentes nestes intervalos (janelas de tempo). A utilização de ionização ESI gera íons de múltiplas cargas, que são ainda mais favorecidas pelo uso de analisador IT, tornando relativamente laboriosa a tarefa de identificar cada peptídeo presente, em cada janela de tempo. Este procedimento de busca dos compostos peptídicos em uma janela de tempo, foi realizado manualmente pela falta de um software específico para tal tipo de análise, e também para que não houvesse dúvidas quanto à deconvolução dos íons; somente aqueles íons que apresentaram envelope de picos com resolução monoisotópica é que foram considerados nas análises. Considerou-se composto diferentes aqueles que, dentro de cada janela de tempo, apresentaram valor de massa molecular diferindo em pelo menos 1 Da.

Esta forma de análise também foi realizada por Davis e colaboradores (2009), onde a diversidade peptídica de diferentes indivíduos da mesma espécie, e entre espécies diferentes de animais do gênero *Conus* foi estudada.

Os cromatogramas de íons totais estão representados juntamente com a identificação das diferentes massas moleculares encontradas em cada janela de tempo, nas três diferentes amostras (Figuras 4, 5 e 6, as quais são referentes às amostras A, B e C). A Figura 7 representa a superposição de todos os peptídeos detectados nas três amostras (A, B e C).

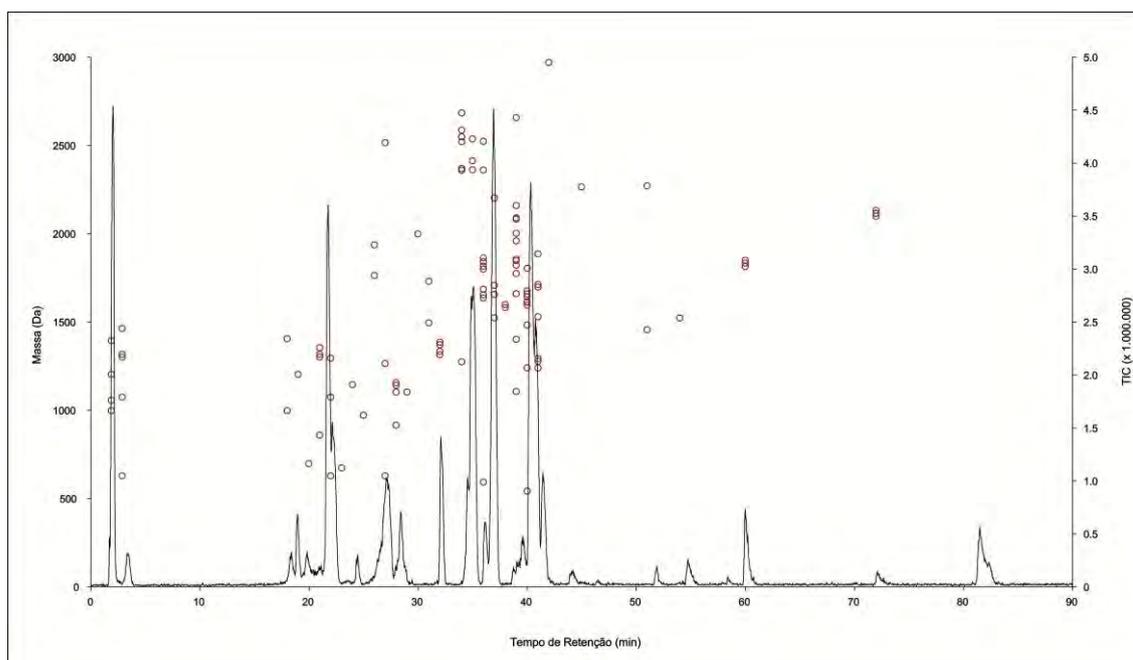


Figura 4: Cromatograma de íons totais (TIC) da amostra A, com identificação das massas moleculares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 3000 Da (pontos vermelhos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.

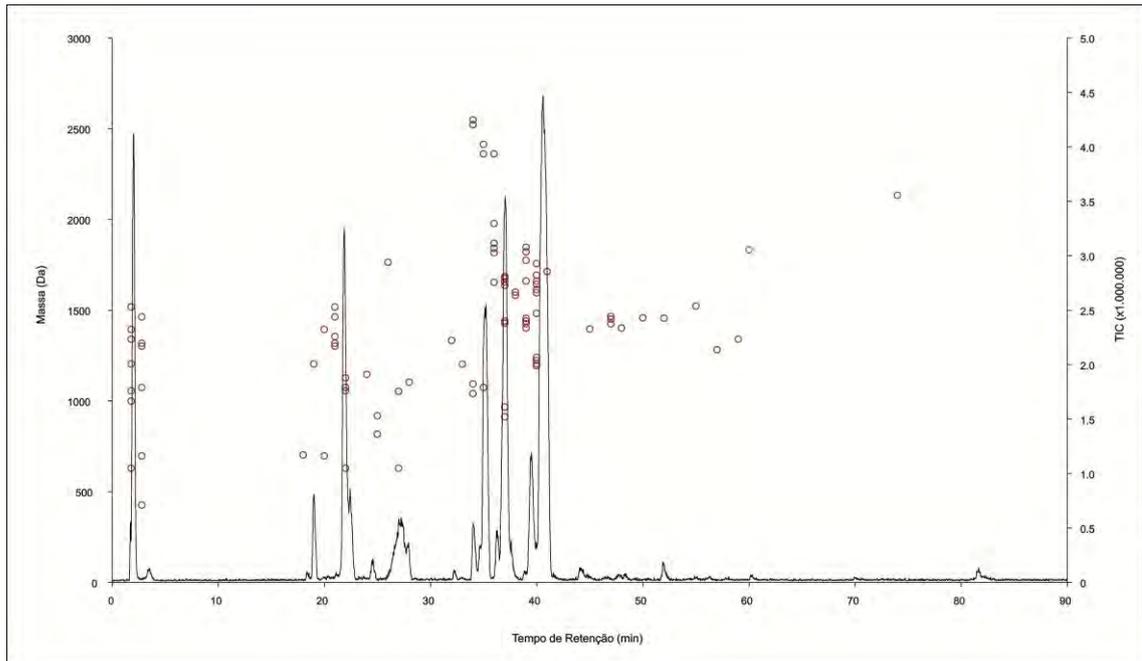


Figura 5: Cromatograma de íons totais (TIC) da amostra **B**, com identificação das massas moleculares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 3000 Da (pontos vermelhos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.

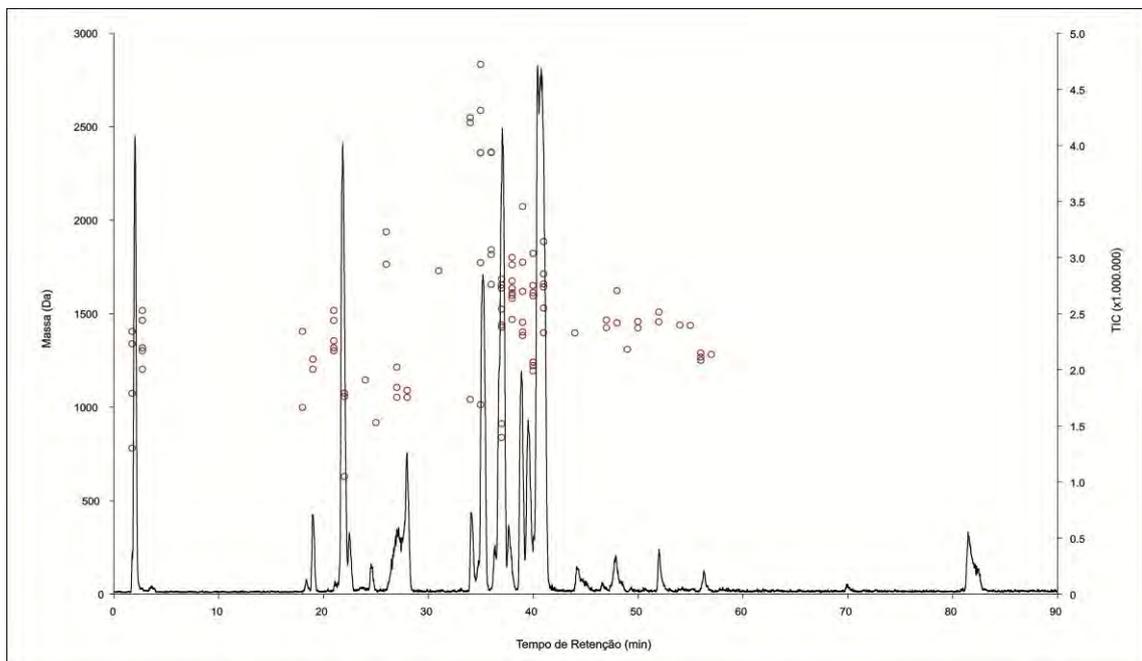


Figura 6: Cromatograma de íons totais (TIC) da amostra **C**, com identificação das massas moleculares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 3000 Da (pontos vermelhos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.

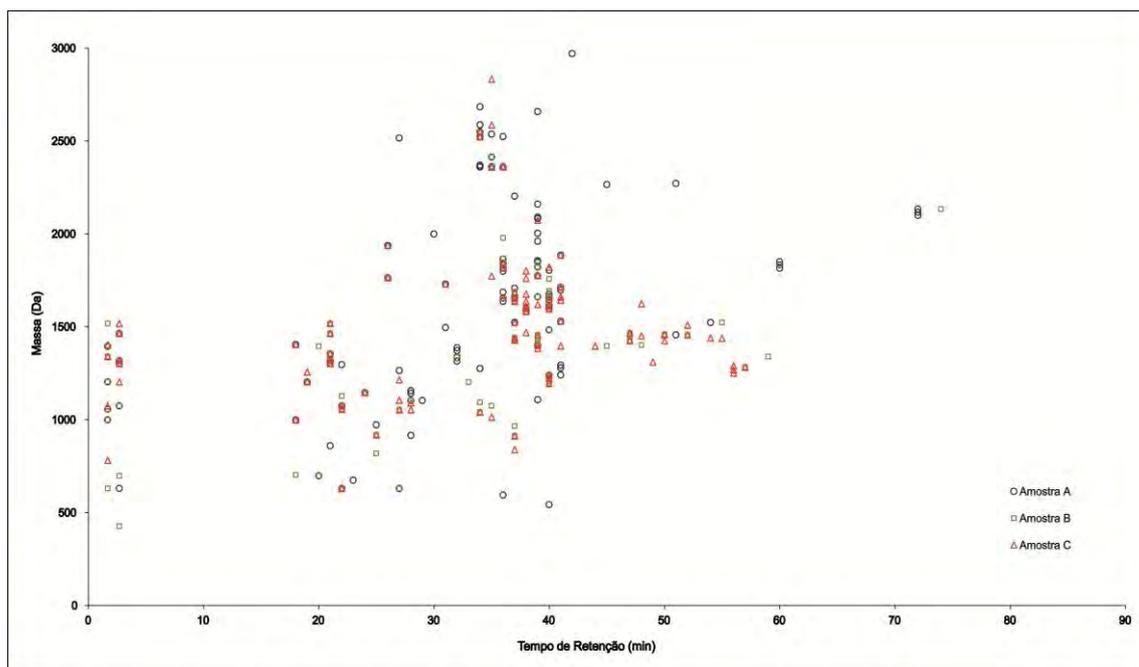


Figura 7: Superposição de todos os peptídeos detectados na amostras **A**, **B** e **C**, no intervalo entre 400 e 3000 Da, em função dos tempos de retenção; ○ = peptídeos da amostra **A**; □ = peptídeos da amostra **B**; △ = peptídeos da amostra **C**.

As análises dos cromatogramas de massas (*TIC*) de cada uma das amostras e a comparação entre as massas moleculares presentes em cada amostra analisada revelaram a existência de muitos peptídeos apresentando massas moleculares diferentes e algumas semelhanças em relação às três amostras. As massas moleculares obtidas para cada um dos peptídeos foi obtida através da deconvolução de espectros apresentando íons com múltiplas cargas (+2,+3,+4 ou mais) para somente íons monoprotonados, como já mencionado anteriormente. Com estes dados foi possível realizar a análise de distribuição das diferentes massas moleculares de cada amostra, bem como do número total de componentes peptídicos acumulados ao longo de todo cromatograma, apresentados em intervalos de massas de 100 Da. As figuras 8,9 e 10 representam o diagrama de barras correspondentes à frequência das faixas de massa molecular das amostras **A**, **B** e **C**, respectivamente.

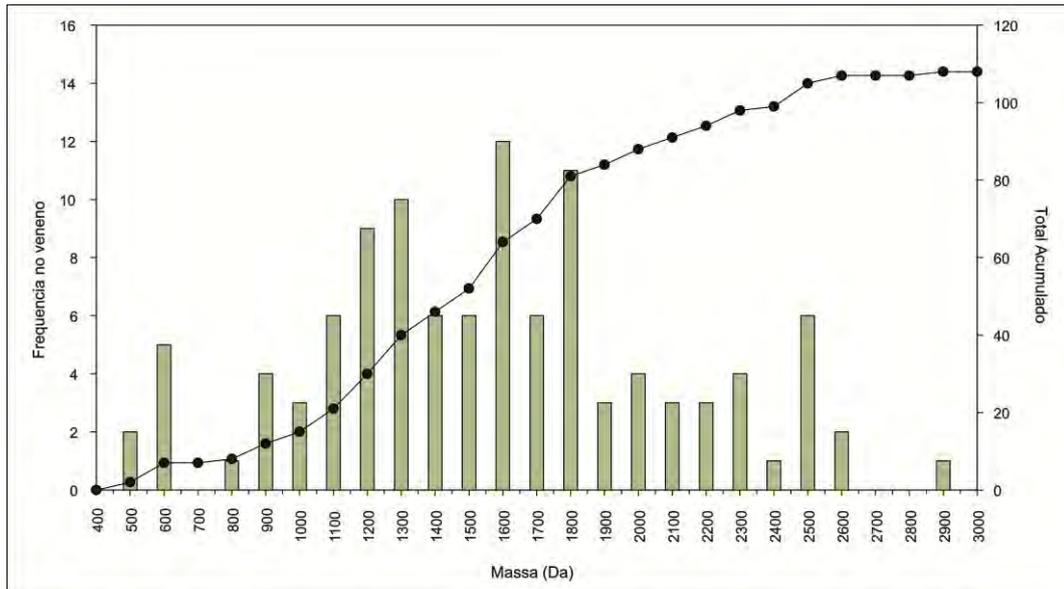


Figura 8: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molecular (no intervalo de 100 Da) encontrada no veneno da vespa *P. paulista* presente na amostra **A**. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.

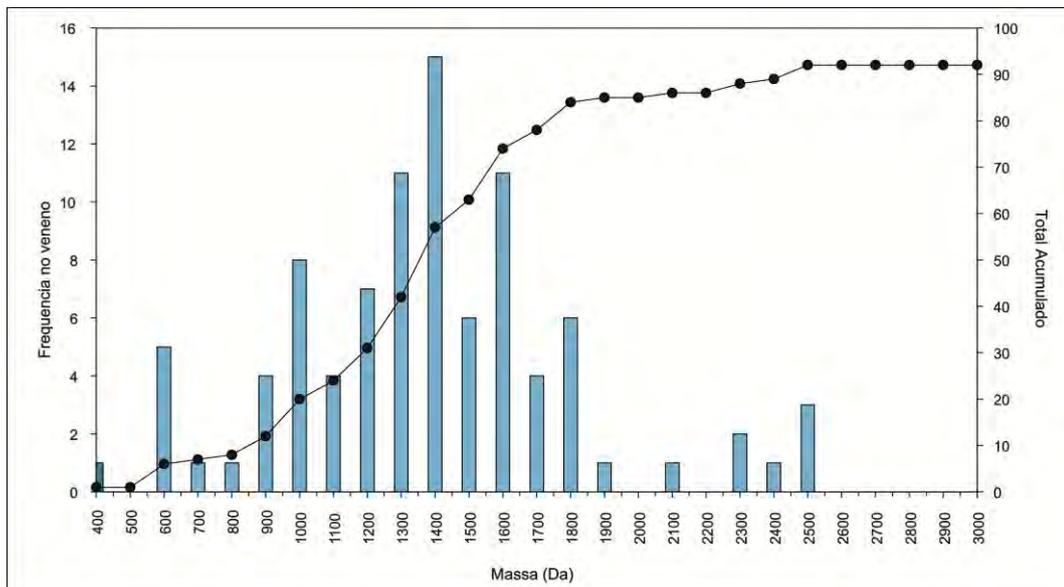


Figura 9: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molecular (no intervalo de 100 Da) encontrada no veneno da vespa *P. paulista* presente na amostra **B**. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.

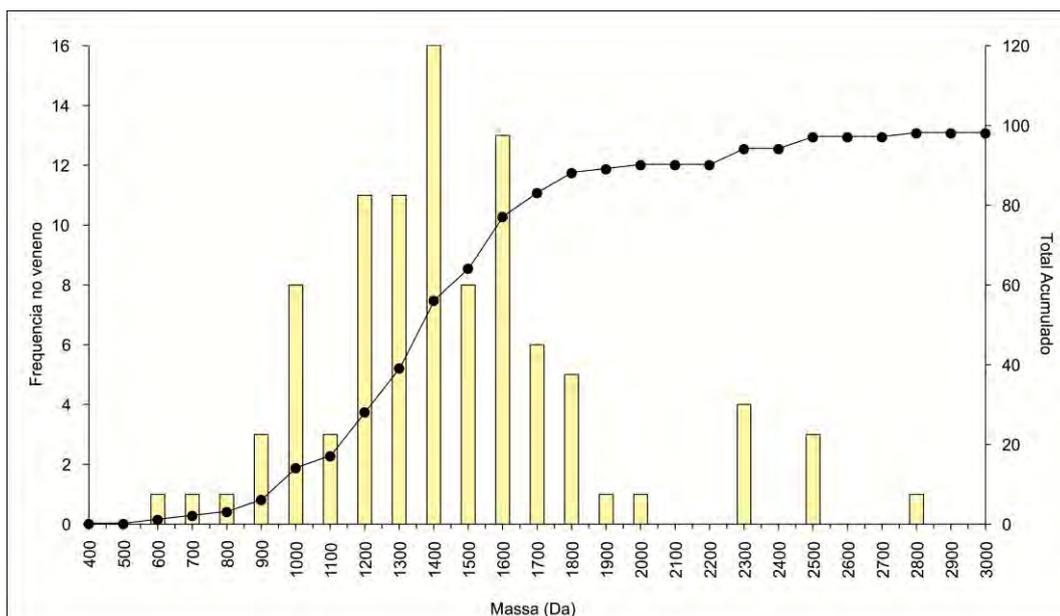


Figura 10: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molecular (no intervalo de 100 Da) encontrada no veneno da vespa *P. paulista* presente na amostra C. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.

Os resultados acima revelam uma enorme complexidade de composição peptídica nos venenos de *P. paulista*, quando se comparam amostras coletadas em diferentes ninhos desta vespa. Foi possível detectar a presença de 108 peptídeos distintos na amostra A, 92 peptídeos na amostra B e 98 peptídeos na amostra C.

Foram observadas maiores quantidades de peptídeos com os valores de massas entre 1200-1300 Da, 1300-1400 Da, 1600-1700 Da e 1800-1900 Da na amostra A; 1300-1400 Da, 1400-1500 Da e 1600-1700 Da na amostra B; e 1200-1300 Da, 1300-1400 Da, 1400-1500 Da e 1600-1700 Da na amostra C. Estes resultados sugerem a existência de diferenças de composição quanto às massas apresentadas e número de diferentes peptídeos em cada amostra de veneno, mesmo considerando-se que trata de uma mesma espécie sob investigação.

A Figura 11 apresenta o diagrama de Venn para comparação entre as amostras A, B e C, de acordo com as massas peptídicas e tempos de retenção encontrados.

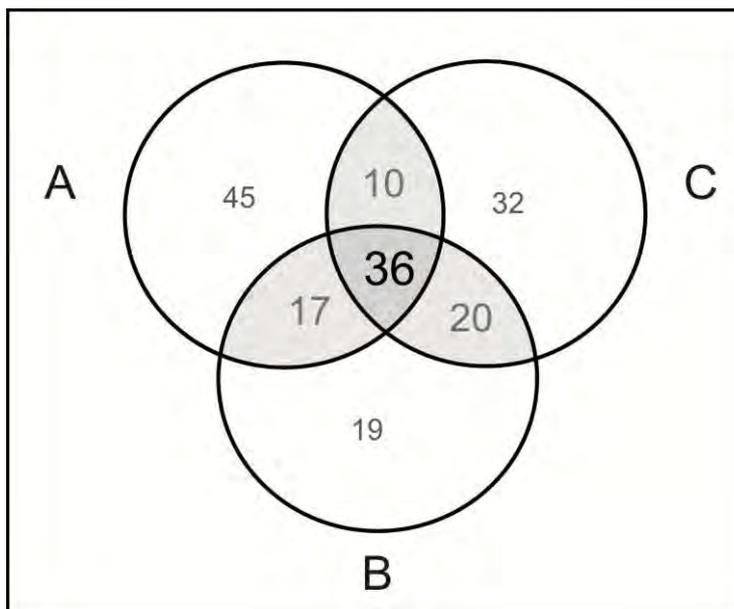


Figura 11: Diagrama de Venn demonstrando o número de peptídeos comuns identificados nas amostras **A**, **B** e **C**, baseado em massas diferindo em ± 1 Da e janelas de tempos de retenção de ± 1 min.

É possível observar que existem 36 peptídeos com massas moleculares e tempos de retenção, comuns entre as três amostras, 17 peptídeos são comuns somente entre as amostras A e B, 10 peptídeos ocorrem nas amostras A e C, e ainda 20 peptídeos que ocorrem nas amostras B e C. Para estas análises, foram considerados peptídeos que diferiram em suas massas moleculares em mais de 1Da, e que possuíam tempos de retenção diferentes em mais de 1 minuto. Peptídeos considerados comuns, foram aqueles compartilhando mesma massa molecular e mesmo tempo de retenção. Neste diagrama pode-se ainda notar a presença de um total de 179 peptídeos diferentes, quando os valores de massas moleculares obtidos para as três amostras (A, B e C) são analisados em conjunto. Tal padrão de semelhanças e diferenças deve estar ligado ao modo reprodutivo dos *Polybiinae*, o que será discutido com mais propriedade no próximo item (4.1.2.), onde foram realizadas comparações do veneno de um mesmo ninho em diferentes épocas do ano, possibilitando uma visão da variação de composição intra-ninho.

4.1.2. Intra-ninho (veneno do mesmo ninho em diferentes épocas do ano)

Além das análises dos venenos pertencentes à ninhos diferentes, foram realizadas análises para avaliar a existência de possíveis diferenças no veneno de *P. paulista* no decorrer do tempo. Para isso, vespas do mesmo ninho (amostra **D**) (Figura 12) foram coletadas em intervalos de tempo de 60 dias (Tabela 2), a fim de verificar a interferência principalmente da genética reprodutiva, na composição desses venenos, uma vez que as vespas pertencentes à espécie *P. paulista* possuem ciclo de vida médio de 60 dias. Decorrido este período, a população do ninho é renovada (CHAUD-NETTO et al, 1994).



Figura 12: Ninho de *P. paulista* utilizado para extração do veneno (Amostra **D**) em diferentes épocas do ano.

Tabela 2: Data de coleta das amostras de veneno do ninho D.

| Nome da Amostra | Data da Coleta |
|------------------------|-----------------------|
| D1: | 26/11/10 |
| D2: | 26/01/11 |
| D3: | 26/03/11 |

Assim, 20µg da porção peptídica do veneno de cada uma das coletas (D1, D2 e D3) foram submetidas à análises de LCMS sob as mesmas condições dos experimentos de análise interninho (item 4.1.1). Foram analisados os cromatogramas UV (com leitura de absorvância am 214nm) das três amostras, sendo os mesmos representados nas figuras 13,14 e 15, para as amostras D1, D2 e D3, respectivamente.

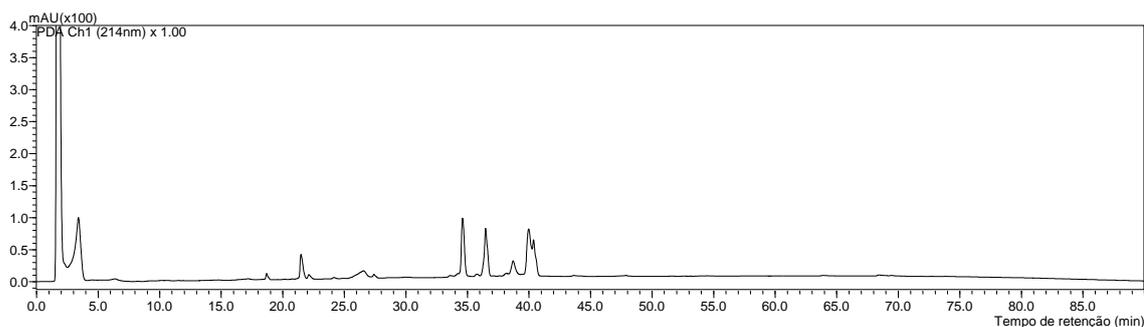


Figura 13: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra **D1** de veneno de *P. paulista* (20 µg), obtido em coluna XBrigde™ BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.

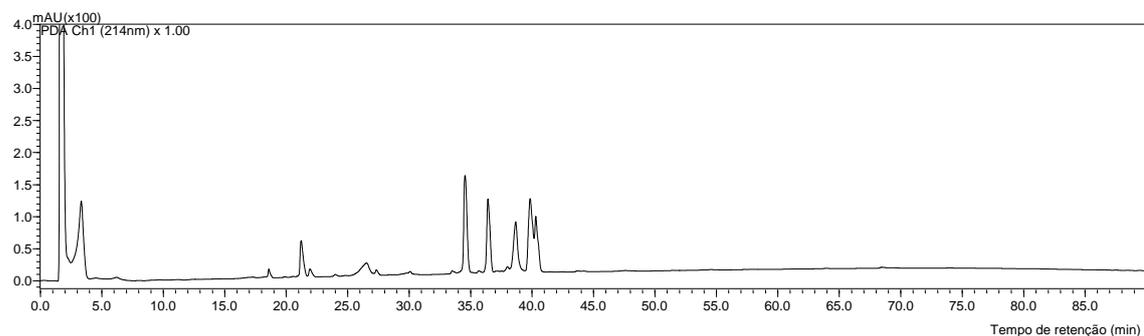


Figura 14: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra **D2** de veneno de *P. paulista* (20 µg), obtido em coluna XBrigde™ BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.

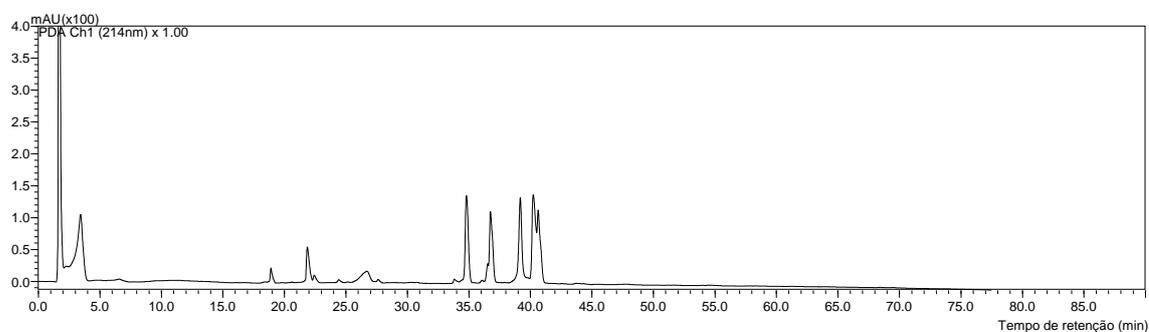


Figura 15: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra **D3** de veneno de *P. paulista* (20 µg), obtido em coluna XBrigde™ BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.

Os cromatogramas UV das amostras D1 (Figura 13), D2 (Figura 14) e D3 (Figura 15) mostraram-se muito semelhantes entre si, sendo difícil perceber as diferenças entre as amostras. Partiu-se então para comparações entre os cromatogramas de íons totais (*TIC*) adquiridos ao mesmo tempo dos cromatogramas de UV.

Os cromatogramas de íons totais estão representados juntamente com a análise das diferentes massas moleculares encontradas nas três amostras (Figuras 16, 17 e 18, as quais são referentes às amostras D1, D2 e D3, respectivamente). A figura 19 trás a superposição da distribuição peptídica das três amostras (D1, D2 e D3).

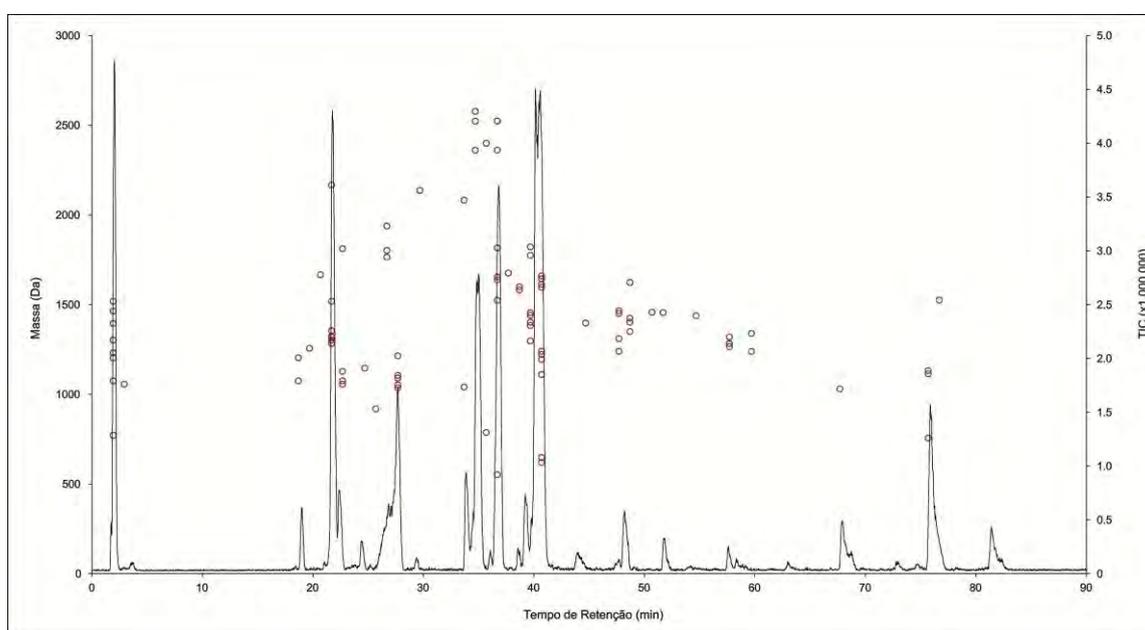


Figura 16: Cromatograma de íons totais (*TIC*) da amostra **D1**, com identificação das massas moleculares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 3000 Da (pontos vermelhos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.

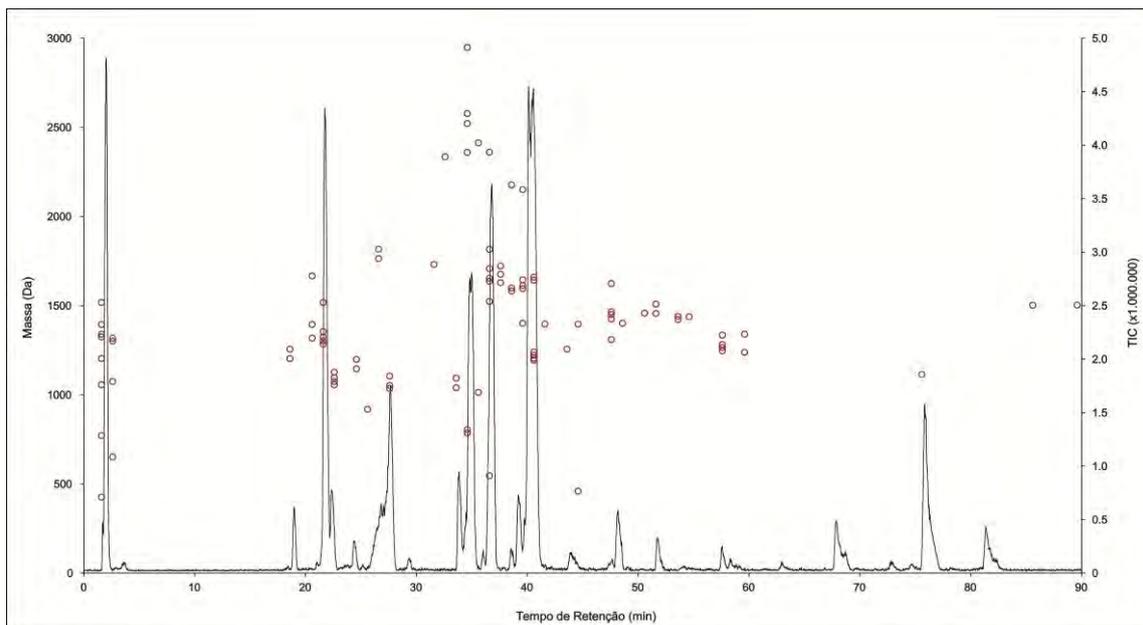


Figura 17: Cromatograma de íons totais (*TIC*) da amostra **D2**, com identificação das massas moleculares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 3000 Da (pontos vermelhos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.

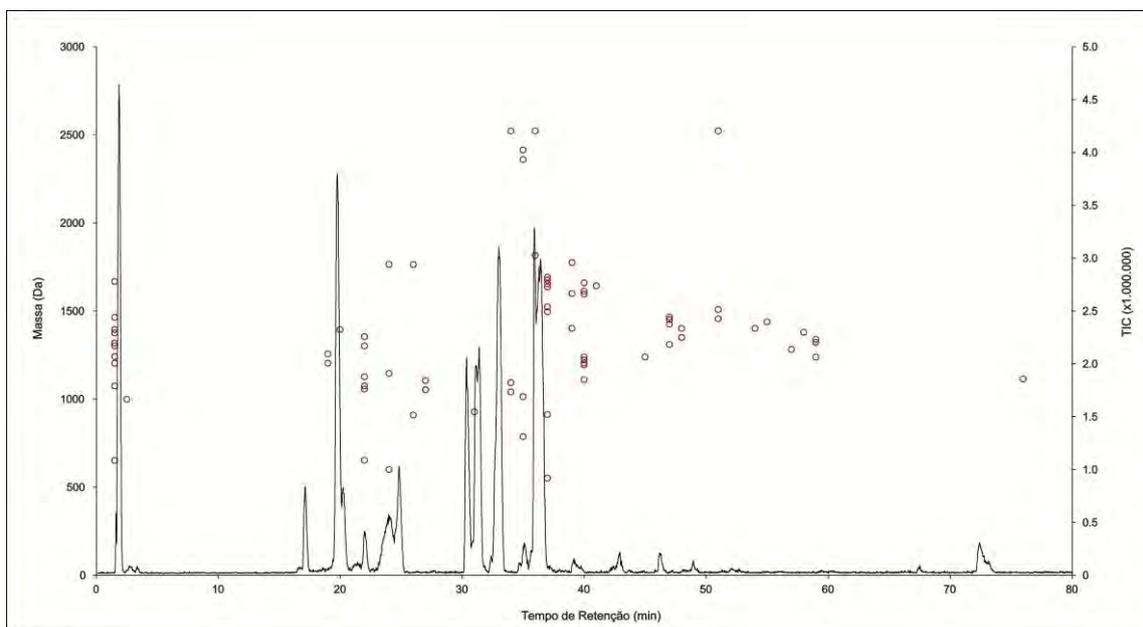


Figura 18: Cromatograma de íons totais (*TIC*) da amostra **D3**, com identificação das massas moleculares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 3000 Da (pontos vermelhos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.

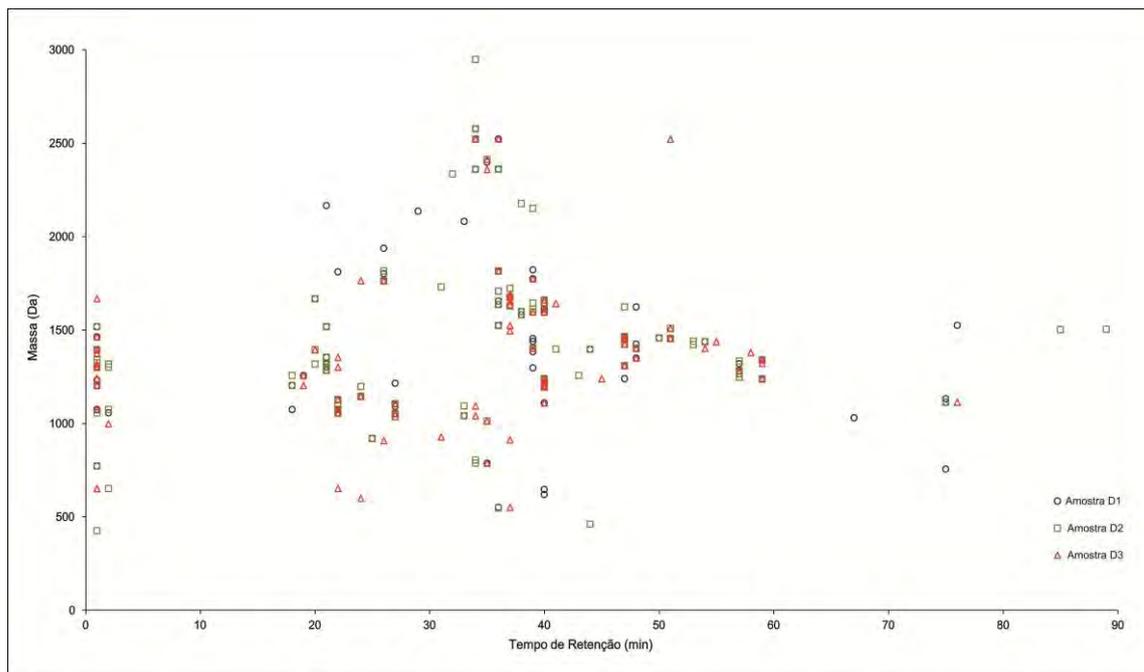


Figura 19: Superposição de todos os peptídeos detectados nas amostras **D1**, **D2** e **D3**, no intervalo entre 400 e 3000 Da, em função dos tempos de retenção; ○ = peptídeos da amostra **D1**; □ = peptídeos da amostra **D2**; △ = peptídeos da amostra **D3**.

As análises dos cromatogramas de massas (*TIC*) de cada uma das amostras, e a comparação entre as massas moleculares presentes em cada amostra analisada revelaram a existência de muitas massas moleculares diferentes nos venenos de um mesmo ninho no decorrer do tempo, e algumas semelhanças em relação às três amostras, assim como no caso das amostras oriundas de diferentes ninhos. As massas moleculares obtidas para cada um dos peptídeos foi obtida através da deconvolução de espectros obtendo íons multiprotonados, para forma de íons monoprotônicos. Com estes dados foi possível realizar a análise de frequência dos intervalos de massas de componentes peptídicos de cada amostra, sendo estes dados representados nas figuras 20, 21 e 22.

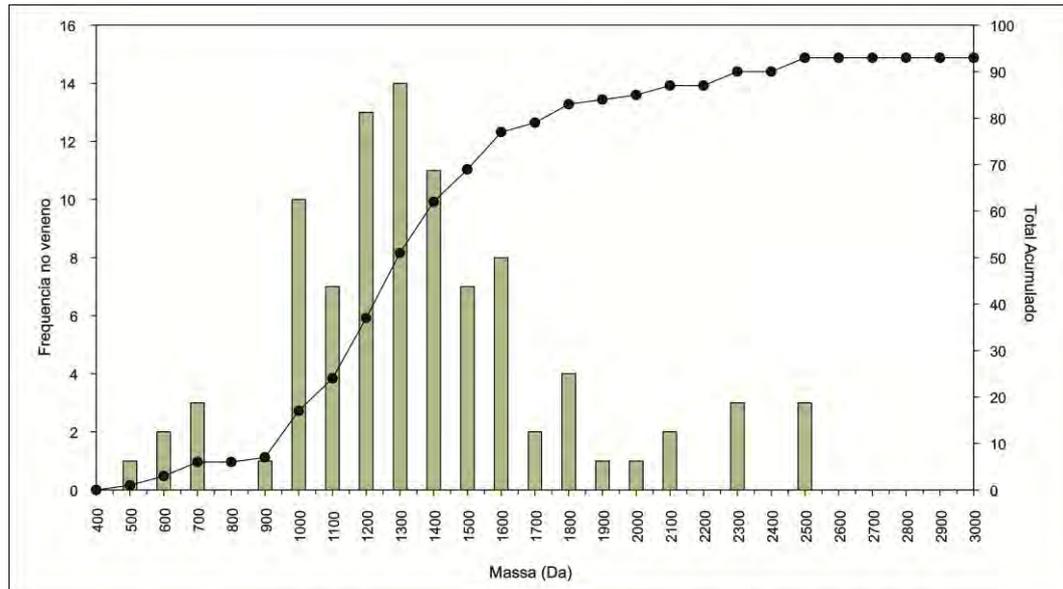


Figura 20: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molecular (no intervalo de 100Da) encontrada no veneno da vespa *P. paulista* presente na amostra **D1**. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.

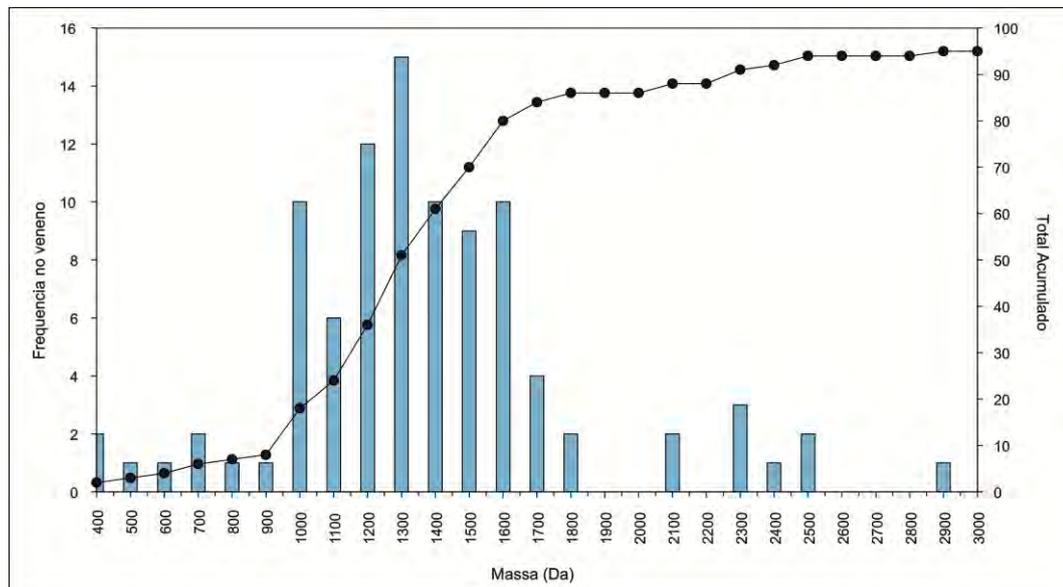


Figura 21: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molecular (no intervalo de 100 Da) encontrada no veneno da vespa *P. paulista* presente na amostra **D2**. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.

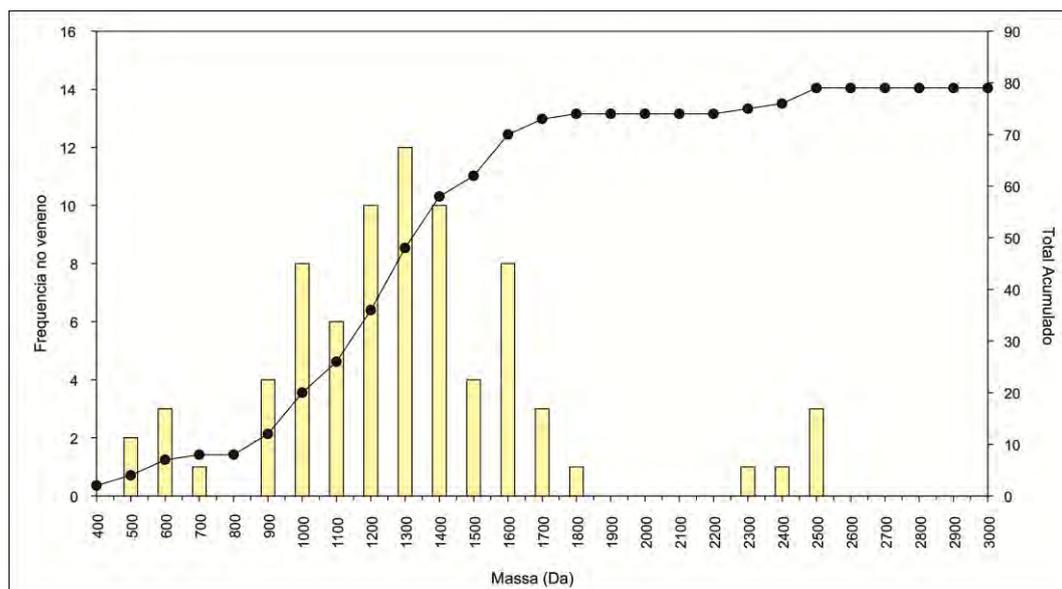


Figura 22: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molecular (no intervalo de 100 Da) encontrada no veneno da vespa *Polybia paulista* presente na amostra **D3**. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.

As análises de distribuição e abundância peptídica possibilitaram um melhor entendimento da complexidade da composição peptídica dentro de um mesmo ninho ao longo de um intervalo de tempo de existência da colônia. Foi possível detectar a presença de 94 peptídeos distintos na amostra **D1**, 95 peptídeos na amostra **D2** e 78 peptídeos na amostra **D3**.

Foram observadas maiores quantidades de peptídeos com os valores de massas entre 1000-1200 Da, 1200-1300 Da, 1300-1400 Da e 1400-1500 Da na amostra **D1**; 1000-1100 Da, 1200-1300 Da, 1300-1400 Da, 1400-1500 Da e 1600-1700 Da na amostra **D2**; e 1000-1100 Da, 1200-1300 Da, 1300-1400 Da, 1400-1500 Da e 1600-1700 Da na amostra **D3**. Além disso, a comparação dos perfis cromatográficos e das curvas de abundância peptídica das amostras revelou diferenças nos tempos de retenção e massas dos peptídeos em todas as coletas. Este fato sugere a existência de diferenças de composição e número de peptídeos em função do período de coleta.

A Figura 23 apresenta o diagrama de Venn para comparação entre as amostras **D1**, **D2** e **D3**, de acordo com as massas peptídicas e tempos de retenção encontrados. O diagrama mostra que existem 44 peptídeos com massas moleculares comuns entre as três amostras, 18 peptídeos que ocorrem nas amostras **D1** e **D2**, 7 peptídeos que ocorrem somente nas amostras **D1** e **D3**, e ainda 8 peptídeos que ocorrem nas amostras **D2** e **D3**.

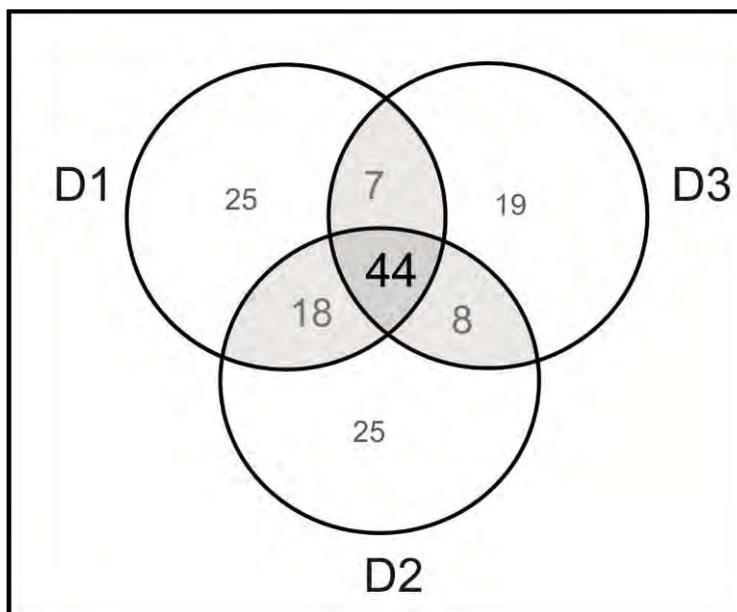


Figura 23: Diagrama de Venn demonstrando o número de peptídeos comuns identificados nas amostras **D1**, **D2** e **D3**, baseado em massas diferindo em ± 1 Da e janelas de tempos de retenção de ± 1 min.

Para estas análises, também foram considerados peptídeos que diferiram em mais de 1 Da, e que possuíam diferenças nos tempos de retenção superiores a 1 minuto. Peptídeos considerados comuns foram aqueles compartilhando mesma massa molecular e o mesmo tempo de retenção. Na figura 23 pode-se ainda notar a presença de 146 peptídeos totais diferentes quando os valores de massas moleculares obtidos para as três amostras (D1, D2 e D3) são analisadas em conjunto.

Assim como no caso do item anterior onde foram analisadas amostras de três ninhos diferentes de *P. paulista*, o padrão de semelhanças e diferenças deve estar ligado ao modo reprodutivo dos *Polybiinae*, que geralmente possui várias rainhas numa mesma colônia, que podem ser irmãs entre si, meio-irmãs, ou mesmo primas. Estas rainhas copulam com vários machos diferentes e armazenam os espermatozóides, que são utilizados em “pacotes” a cada nova progenia, que corresponde a um período entre 45 e 60 dias (CHAUD-NETTO, 1994). Isto significa que numa mesma colônia coexistem várias diferentes progênes de vespas, com cargas genéticas maternas relativamente conservadas, e diferentes cargas genéticas paternas. Este fato cria um enorme polimorfismo genético, que provavelmente resulta numa grande biblioteca peptídica em potencial, em cada colônia de vespas. Desta maneira, o padrão de semelhanças e diferenças no perfil peptídico total dos venenos, revela a enorme riqueza química que este tipo de inseto representa na natureza, tanto nas análises inter-ninho quanto intra-ninho. O período de tempo espaçado de 60 dias entre as coletas do mesmo ninho se

justifica porque este é o tempo médio de vida de cada operária, e também porque este corresponde ao tempo necessário à substituição de uma progênie completa.

PARTE II:

4.2. Sequenciamento dos peptídeos encontrados nos venenos.

Levando-se em consideração os peptídeos presentes em todas as amostras analisadas, foram escolhidos alguns peptídeos para uma investigação mais detalhada. Como referência foi utilizado o cromatograma de íons totais da amostra **A** para a análise qualitativa dos peptídeos, onde as frações do cromatograma de íons totais foram numeradas de 1 a 24. (Figura 24).

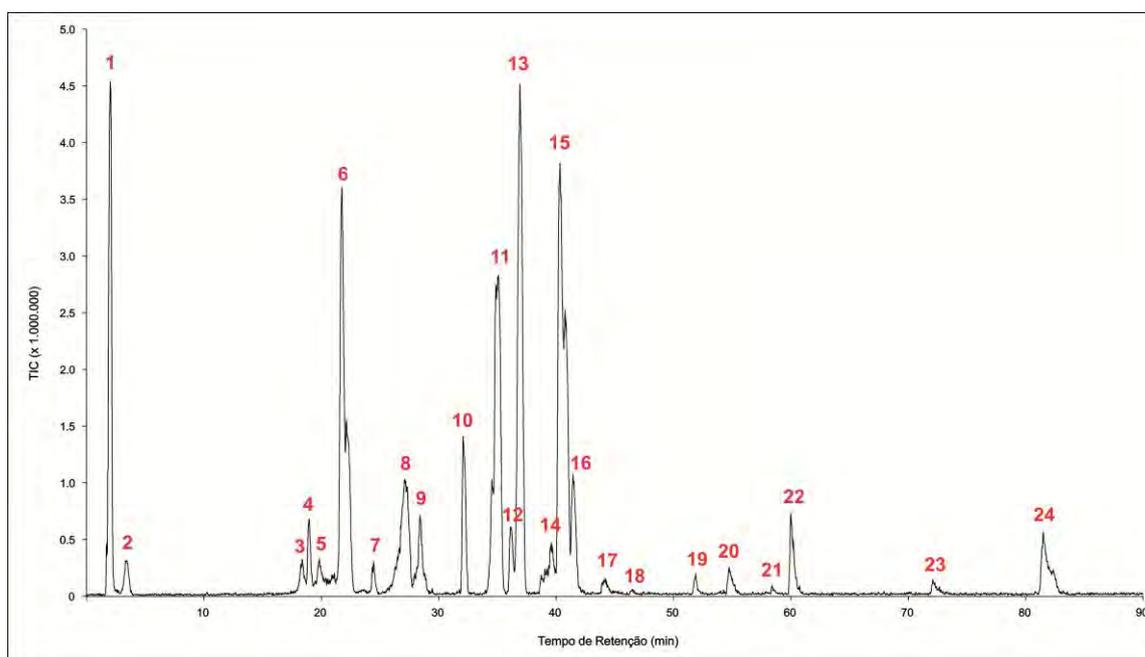


Figura 24: Cromatograma de íons totais (*TIC*) da amostra **A**, obtido a partir da análise LC-MS em coluna XBrigde™ BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min durante 90 minutos. Em vermelho está a numeração das frações pertencentes ao veneno para referencia nas análises posteriores.

As análises de MS foram realizadas no modo positivo, uma vez que apresenta uma sensibilidade mais elevada quando comparadas com análises feitas no modo negativo. Além disso, o modo positivo é capaz de gerar espectros com maior riqueza de íons fragmentos específicos para uma determinada sequência. Em contrapartida, espectros MS² de íons negativos contêm pouca informação sobre a sequência e são normalmente mais difíceis de interpretar (SEIDLER et al., 2010). Diante destas informações, todos os peptídeos deste trabalho foram analisados no modo positivo (ESI+).

Durante a fragmentação peptídica em condições de *CID*, ocorre a formação dos íons-fragmentos, que recebem uma nomenclatura específica dependendo da região da molécula que retêm a carga residual (próton). Quando a carga residual permanece no lado N-terminal,

são gerados os íons do tipo *a*, *b* e *c* (dependendo de qual ligação química foi desfeita), por outro lado, quando a carga residual permanecer no lado C-terminal, são gerados os íons do tipo *x*, *y* e *z* (dependendo de qual ligação química foi fragmentada). Os pares de íons *a/x*, *b/y* e *c/z* são correspondentes a fragmentos opostos e complementares entre si. Desta forma, por exemplo, sempre uma série de íons do tipo *b* é completar à série de íons do tipo *y*. Essa complementaridade e a presença de várias séries de íons permitem comprovar através de simulações de fragmentação, se uma sequência obtida está realmente correta. A nomenclatura mais aceita para anotação de íons pertencentes às sequências peptídicas está representada na figura 25, como foi originalmente proposto por Roepstorff e Fohlman (1984) e posteriormente modificada por Biemann (1990).

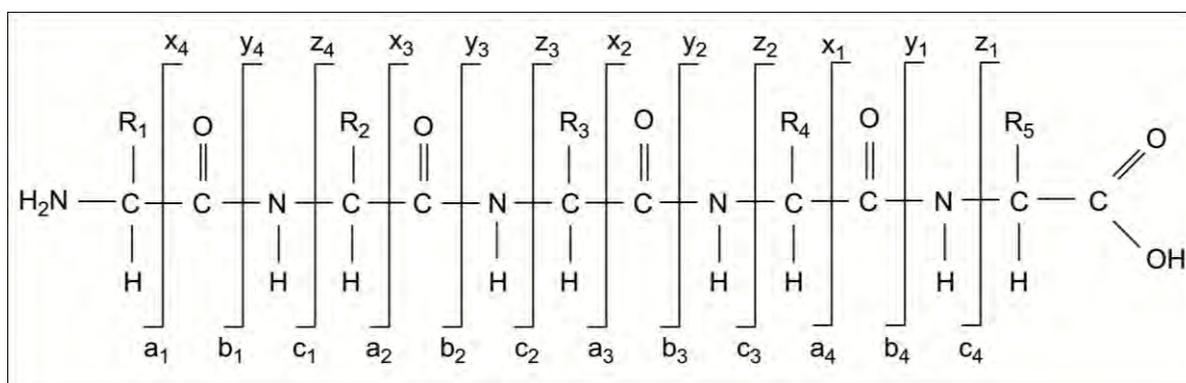


Figura 25: Nomenclatura das principais séries de íons formados através de fragmentação peptídica: íons *a*, *b*, *c*, *x*, *y*, e *z*. (de acordo com Biemann, 1990). Rearranjos de hidrogênio estão omitidos nesta anotação simplificada. R1, R2 e R3 representam as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.

Os equipamentos do tipo “*ion-trap*” (IT) ou armadilhas de íons são bem conhecidos por sua alta eficiência em experimentos de espectrometria de massa sequencial (MSⁿ). O IT é o análogo tridimensional do filtro de massa quadrupolar linear. No IT os íons são submetidos à forças aplicadas por um campo de RF (radio frequência), porém tais forças ocorrem em três dimensões, ao invés de apenas duas. Movimentos estáveis de íons no quadrupolo linear permitem que íons livres se movimentem em uma única dimensão (direção Z₀). No entanto, no *ion-trap* não existe esse grau de liberdade, uma vez que os íons estão armazenados dentro de um sistema constituído de três eletrodos (um eletrodo em anel e dois eletrodos em seção transversal hiperbólica) (Figura 26). Os íons são então bombardeados em todas as direções para que viagem em órbitas discretas dentro do campo (WONG; COOKS, 1997).

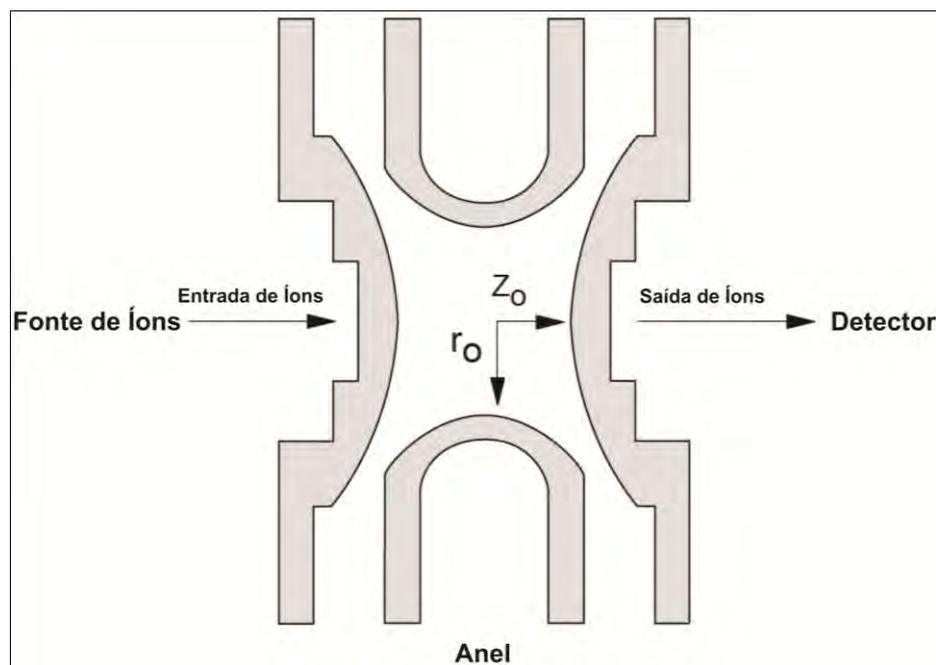


Figura 26: Representação esquemática de um analisador do tipo “ion-trap”. O sistema consiste de três eletrodos com superfície hiperbólica: o anel central e duas seções transversais. O esquema demonstra como os eletrodos estão alinhados e isolados através de espaçadores de cerâmica. O dispositivo é radialmente simétrico sendo que r_0 e z_0 representam o seu tamanho (WONG; COOKS, 1997).

Ao longo dos anos os equipamentos do tipo IT se tornaram um dos equipamentos mais utilizados para o sequenciamento de peptídeos, uma vez que estes apresentam vantagens sobre outros equipamentos para análises realizadas via dissociação induzida por colisão (*CID*). Íons precursoros são excitados com aumento de energia cinética por efeito do *CID*. Ocorre a colisão entre o gás e os íons, sendo que a energia cinética é convertida em energia interna do íon. Uma vez que o íon atinge a energia crítica de dissociação, antes de sua energia cinética exceder a energia necessária para “escapar” do aprisionamento, e o íon é ressonantemente ejetado, o íon-precursor pode dissociar-se em íons-produtos. O movimento de íons deve ser pequeno o suficiente para permanecer na armadilha de íons, mas suficientemente grande para que a energia cinética possa ser convertida em energia interna, necessária para induzir a dissociação de íons-produtos (SHIPKOVA et al., 2008; CHARLES et al., 1994).

Inicialmente foram escolhidos alguns peptídeos já conhecidos do veneno de *P. paulista* para se estudar os padrões de fragmentação, gerados com a utilização de um espectrômetro de massas do tipo ESI-IT-TOF e para a padronização da forma de interpretação dos espectros de massas sequenciais (MS^n), que foram utilizados para o sequenciamento peptídico. Os peptídeos escolhidos foram os pertencentes às frações 13, 15 e 16, correspondentes aos peptídeos Polybia-MPI, Polybia-MPII e Polybia-CP, respectivamente.

O primeiro peptídeo estudado foi o peptídeo de massa molecular 1238,8 Da (Figura 27). Este peptídeo foi encontrado na fração 16, com tempo de retenção de 41,2-41,9 minutos, sendo visualizado nos experimento de MS através do íon de m/z 620,43 na forma $[M+2H]^{+2}$.

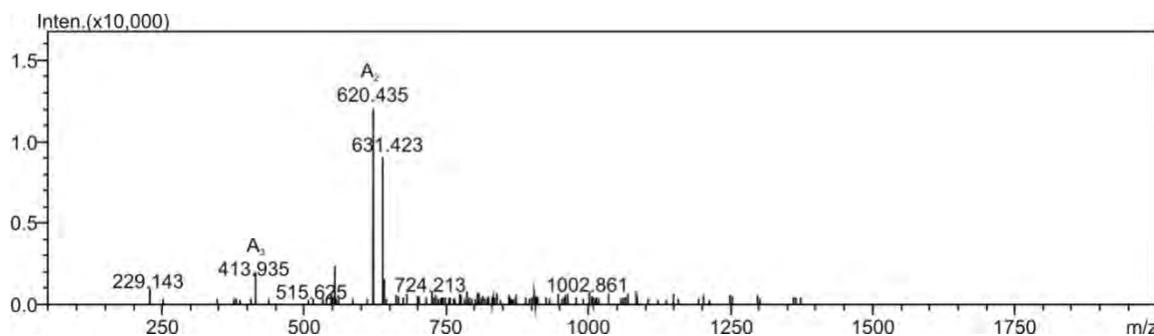


Figura 27: Espectro MS^1 referente ao peptídeo de massa molecular 1238,8 Da observado no tempo de retenção de 41,2-41,9 min (fração 16); A_2 e A_3 correspondem aos íons de m/z 620,4 e 413,9 na forma $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente.

Os espectros gerados através de fonte de ionização do tipo ESI, normalmente formam íons com múltiplas cargas (+2,+3,+4, etc), especialmente quando o experimento é realizado em instrumentos equipados com analisadores de massas do tipo *ion-trap*. Devido à sua arquitetura funcional de construção, este tipo de analisador propicia colisões de baixa energia entre os íons favorecendo a transferência de carga entre os mesmos, privilegiando os íons contendo mais de uma carga (PRENTICE et al., 2011).

Para que fosse possível interpretar os espectros de MS^2 , foi necessário deconvoluir e reconstruir cada espectro original, para a forma de íons monoprotônicos $[M+H]^+$. Essa deconvolução e a reconstrução foram feitas de forma manual, com a utilização da ferramenta “*mass table*”, presente no software “*LCMS solution v.3.6*” (SHIMADZU). A função “*mass table*” disponibiliza uma planilha, com as informações de valores m/z , intensidade e carga de cada íon presente no espectro de MS^2 , além da informação de quais íons são monoisotópicos. Apesar da maior parte do “*mass table*” conter informações corretas, o tratamento manual do espectro é necessário, pois algumas vezes ocorrem erros na indicação dos valores de massa monoisotópica, pelo algoritmo de processamento de dados do instrumento. Sendo assim, cada espectro de MS^2 teve seus íons conferidos manualmente com relação à carga e relação massa/carga (m/z), para evitar possíveis erros na interpretação. Este processo junto à deconvolução dos íons foi realizado com a utilização da planilha de dados Excel (MICROSOFT 2010), sendo esta fundamental para a transformação de todos os íons de múltiplas cargas em íons monoprotônicos. Para este processo foi utilizada a seguinte equação

(equação 1) para se calcular a massa molecular dos peptídeo e para a deconvolução dos espectros, sendo que a mesma foi adicionada como uma ferramenta no software.

$$\text{Massa (Da)} = (m/z \times Z) - Z,$$

onde m = massa e z = carga

Na deconvolução dos espectros de fragmentação em condições *CID* (MS^2), para a determinação da sequência dos peptídeos, foram considerados somente os íons que possuíam distribuição isotópica completa. Foram utilizados apenas os valores de m/z monoisotópicos dos íons gerados.

Foram determinadas condições experimentais ideais para gerar fragmentação dos peptídeos em suas ligações peptídicas, seguido da identificação das diferenças de massas entre os picos consecutivos de fragmentos correspondentes às massas dos resíduos de amino ácidos naturais ($-NH-CHR-CO-$). Como resultado da fragmentação das ligações peptídicas, são obtidas principalmente séries de íons *b* e *y* (complementares entre si), de modo que a diferença de valores de m/z entre dois íons consecutivos da mesma série, revela a massa de um resíduo de aminoácido, e portanto a identidade do mesmo. Enquanto as séries *b* e *y* resultam diretamente da clivagem das ligações peptídicas, os íons *a* são formados pela perda neutra de monóxido de carbono dos íons *b* (diferença de 27,9949 *u.m.a* relativo ao íon *b* correspondente) (TABB et al., 2003; DONGRE et al., 1996). Considerando todos os íons que teoricamente podem ser produzidos em condições de *CID*, os íons *b* e *y* correspondem à grande maioria dos íons experimentalmente observados.

Dessa forma, foi possível o reconhecimento de uma ou mais séries de íons (dos tipos *b* e/ou *y* principalmente), os quais por sua vez, permitem a determinação das sequências dos peptídeos. Tal trabalho é bastante difícil devido a uma série de fatores, dentre os quais pode-se citar:

- i) o conjunto de íon-fragmentos esperados, pode não estar presente na íntegra, ou em outras palavras, pode haver a ausência de alguns íons das séries *b* e/ou *y*;
- ii) alguns íon-fragmentos podem sofrer rearranjos internos e/ou fragmentação;
- iii) os íons podem estar presente com diferentes estados de carga, dificultando a correta atribuição dos íons (tal dificuldade aplica-se na interpretação de espectros que não são deconvoluídos);
- iv) alguns fragmentos podem sofrer rearranjo neutro de hidrogênios durante a fragmentação.

Para que estes problemas fossem resolvidos e a interpretação dos espectros fosse confiável, mais de uma série de íons foi utilizada para determinar a sequência do peptídeo, principalmente íons da série *b* e *y*, frequentemente complementadas por íons da série *a* e/ou *z*. (aqueles mais abundantes nos espectros de MS² em cada caso).

Apesar das séries *b* e *y* serem as mais intensas na maior parte das vezes durante os experimentos realizados, um fato interessante encontrado no presente trabalho foi a formação de íons da série *z* em muitos espectros de MS²; assim, esse tipo de fragmentação foi utilizada para a interpretação de sequência de alguns dos espectros. A perda de “-NH.” dos íons *y* no interior do espectrômetro de massas, devido às condições físico-químicas dentro do equipamento, pode ser a causa da formação dos íons *z*, uma vez que praticamente não se observou a formação de íons do tipo *c* (o oposto do íon *z*).

Como mencionado anteriormente, estes experimentos foram realizados em um equipamento do tipo IT, onde os íon-fragmentos gerados são formados através de aplicação de frequência de excitação ressonante para o íon-precursor, correlacionada a uma relação massa-carga (*m/z*), o qual é então fragmentado por colisões com o gás argônio no interior do *trap*. Isso normalmente resulta em fragmentações em uma direção única, desde que os íons produtos possuam massas diferentes do íon-precursor. Eles já não estão em ressonância com a frequência de excitação e, portanto, sofrem menos colisões adicionais e, geralmente, menos fragmentação (DREXLER et al., 2007). O resultado é um espectro constituído de íon-fragmentos com menos íons (pertencentes a somente algumas séries), porém com maiores intensidades relativas. Este fenômeno foi descrito previamente (JOHNSON; YOST, 1990) para moléculas pequenas, onde os processos de *CID* foram diretamente comparados entre “*ion-trap*”, triplo-quadrupolos e quadrupolos, e mostrou-se que o “*ion-trap*” tem maior eficiência de fragmentação, coleta, seleção de massa, e transmissão de íon-fragmentos para o detector. No entanto, análises de MS² em um IT são feitas “*in time*”, ou seja, ocorre um processo em série para a coleta, o isolamento de íons-precursor, fragmentação e detecção de íons fragmento (SHIPKOVA et al., 2008).

O espectro MS² do peptídeo pertencente à fração 16 (Figura 27), foi obtido através da seleção do íon-precursor de *m/z* 620,43 na forma [M+2H]⁺², para fragmentação em condições de *CID* do peptídeo de massa molecular 1238,8 Da. A figura 28A mostra o espectro MS² não deconvoluído deste íon, com íons apresentando múltiplas cargas. As figuras 28B e 28C correspondem às ampliações das regiões espectrais de *m/z* de 611 a 615 e de *m/z* 601 a 605 do espectro 28A. Pode-se observar que o íon de *m/z* 602,9 na forma [M+2H]⁺² (Figura 28A e 28C) corresponde ao íon deconvoluído de *m/z* 1204,8 na forma [M + H]⁺ (Figura 29);

enquanto que o íon de m/z 611,9 na forma $[M+2H]^{+2}$ (Figura 28B) corresponde ao íon deconvolvido de m/z 1222,8 na forma $[M + H]^+$ (Figura 29). As Figuras 28B e C mostram ainda em detalhes ampliados os envelopes de picos monoisotópicos dos íons de m/z 602,91 e m/z 611,92. Nesta ampliação é possível observar a diferença de m/z entre os espectros centróides de picos vizinhos com valor de 0,5 unidades. Essa diferença é característica de íons de carga +2. A figura 29 mostra o espectro de MS^2 deconvolvido e reconstruído para todos os íons observados no espectro da figura 28A.

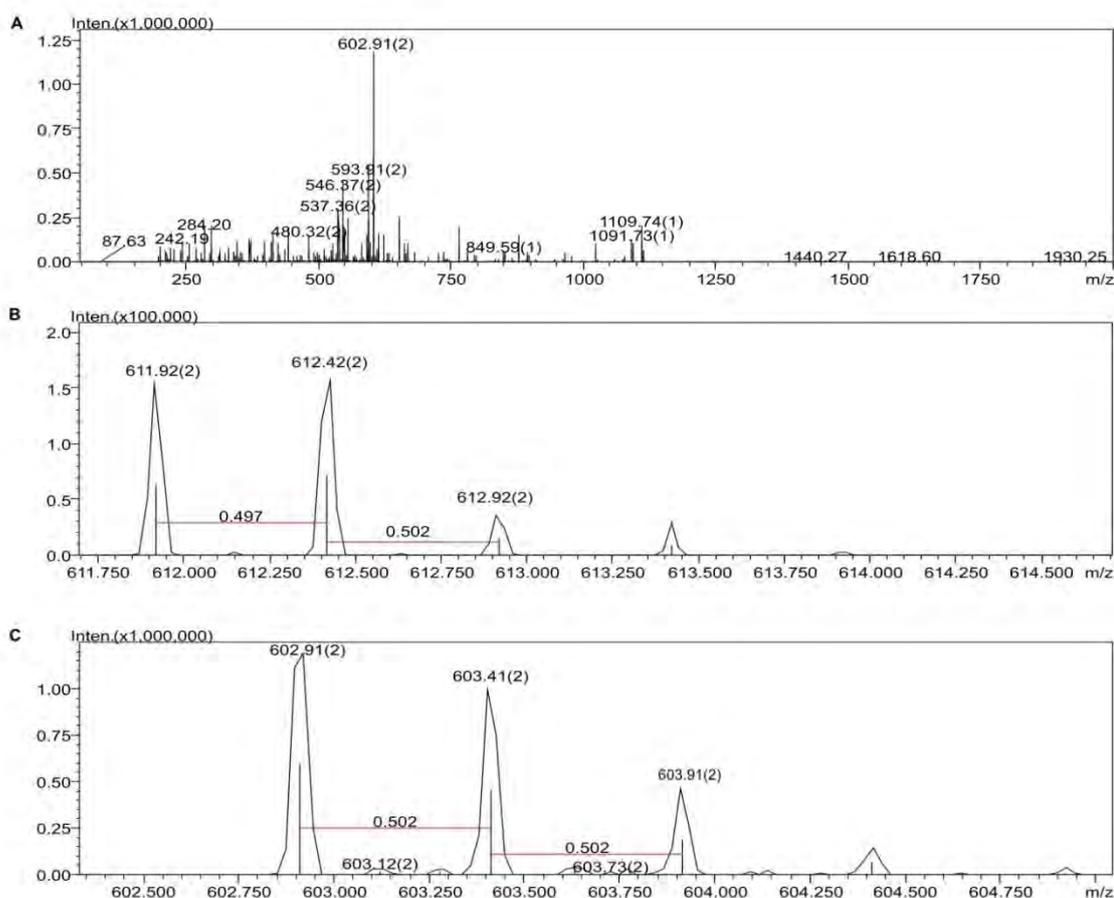


Figura 28: A: Espectro MS^2 não deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1238,8 Da (fração 16). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 620,432 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. B: Ampliação da região de m/z 611 a 615 do espectro MS^2 mostrando o envelope monoisotópico do íon de m/z 611,92 na forma de $[M+2H]^{+2}$; C: Ampliação da região de m/z 601 a 605 do espectro MS^2 mostrando o envelope monoisotópico do íon de m/z 602,91 na forma de $[M + 2H]^{+2}$. As faixas vermelhas nas figuras B e C demonstram a diferença de 0,5 Da, o que caracteriza íons de carga +2.

O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 29) como sendo o íon de m/z 1239,8 na forma $[M+H]^+$. A perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1222,8. Uma série completa de íons b pode ser observada no espectro: m/z 1109,7 (b_{11}), m/z 1022,7 (b_{10}), m/z 894,6 (b_9), m/z 781,5 (b_8), m/z 668,4 (b_7), m/z 611,4 (b_6), m/z 498,3 (b_5), m/z 385,2 (b_4), m/z 284,2 (b_3) e m/z 227,2 (b_2). Como esperado o íon b_1 não foi

encontrado, sendo b_2 o mais frequente neste tipo de análise (HUNG et al., 2007). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a determinação da sequência do peptídeo, com algumas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q. Além disso pode-se observar a formação de vários íons do tipo z , como foi explicado anteriormente.

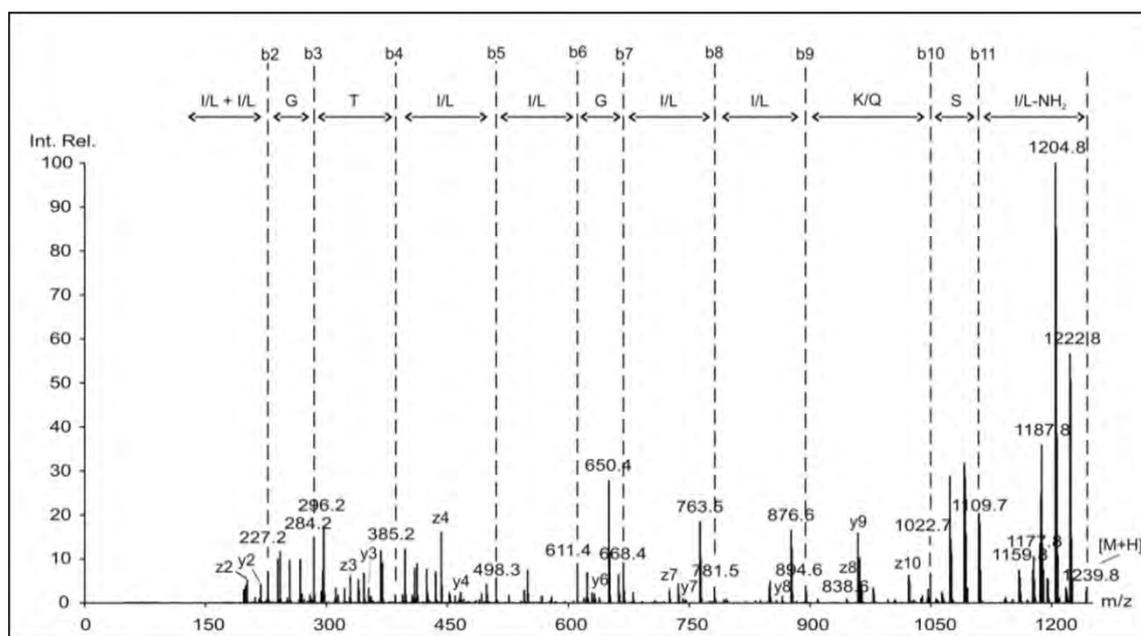


Figura 29: Espectro MS^2 deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1238,8 Da (fração 16). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 620,4 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 1239,8 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

Todas as sequências deste trabalho foram obtidas através de cálculos manuais realizados com os valores monoisotópicos dos íons pertencentes aos espectros MS^2 , uma vez que o software *LCMS solution* (SHIMADZU) não exporta os dados de maneira compatível, para os algoritmos de deconvolução e interpretação, comercialmente existentes no mercado, como por exemplo os softwares Peaks, X!Tandem, OMSSA, etc. Fizemos várias tentativas de utilização dos algoritmos comerciais mencionados, para simplificar o trabalho de interpretação, porém os formatos do produto da Shimadzu não foi compatível com os produtos comerciais, nem mesmo com auxílio do pessoal de apoio das empresas produtoras destes algoritmos. Assim, a interpretação totalmente manual aumentou muito o tempo para interpretação dos espectros, porém não inviabilizou o trabalho.

A sequência determinada para o peptídeo de massa molecular 1238,8 Da presente na fração 16 do cromatograma de íons totais levando em consideração as séries de íons b , y e z

foi: **I/L I/L G T I/L-I/L G I/L I/L K/Q S I/L** (Figura 29). A massa molecular do peptídeo (1238,8 Da), com a sequência mostrada acima, é compatível com a porção C-terminal na forma amidada; portanto a sequência deste peptídeo é: **I/L I/L G T I/L I/L G I/L I/L K/Q S I/L-NH₂**.

Esse peptídeo já havia sido identificado no veneno de *P. paulista* por de Souza e colaboradores (2005), tendo sido denominado “Polybia-CP”, com a sequência: ILGTILGLLKSL-NH₂. Este peptídeo apresenta reduzida atividade desgranuladora e de lise de mastócitos, como é esperado para a maioria dos peptídeos quimiotáticos dos venenos de vespas, além de baixa atividade hemolítica em eritrócitos de ratos (DE SOUZA et al., 2005).

Além do peptídeo demonstrado anteriormente, outros dois peptídeos conhecidos deste veneno foram encontrados nos experimentos de LC-MS no presente trabalho, e foram também utilizados para corroborar a padronização da forma de interpretação dos espectros a ser aplicada nos novos peptídeos. Estes dois peptídeos estão representados pelo íon de m/z 806,9 na forma de $[M+2H]^{+2}$ (Figura 30), correspondente ao peptídeo de massa molecular 1611,9 Da com tempo de retenção de 40-40,8 minutos (Fração 15); o outro peptídeo é caracterizado pelo íon de m/z 827,5 na forma de $[M+2H]^{+2}$ (Figura 33), correspondente à massa molecular de 1653,0 Da, eluído no tempo de retenção de 36,5-37,4 minutos (Fração 13).

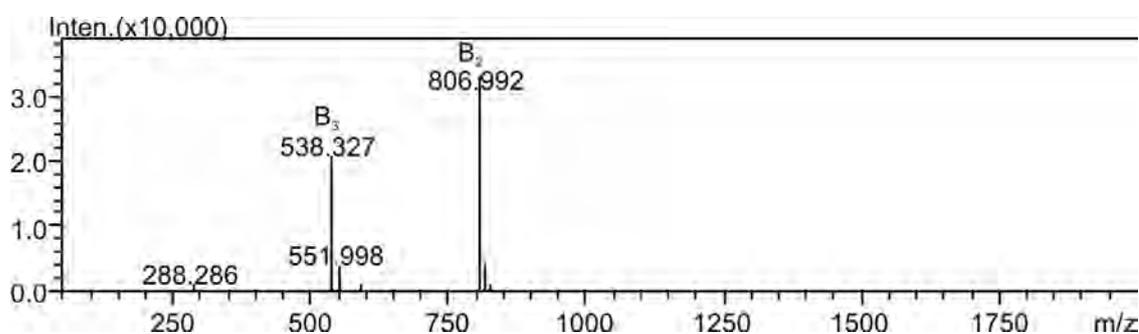


Figura 30: Espectro MS¹ referente ao peptídeo de massa molecular 1611,9 Da, eluído com o tempo de retenção de 40-40,8 minutos (fração 15); os íons de m/z 806,9 (B₂) e 538,3 (B₃) correspondem ao íon molecular do peptídeo nas formas de $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente.

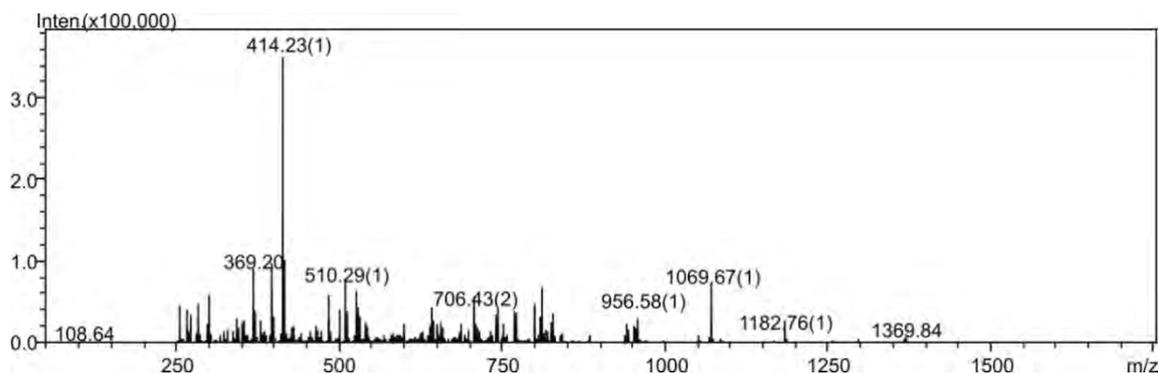


Figura 31: Espectro MS² não deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1611,9 Da. Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 806,9 na forma de $[M+2H]^{2+}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo.

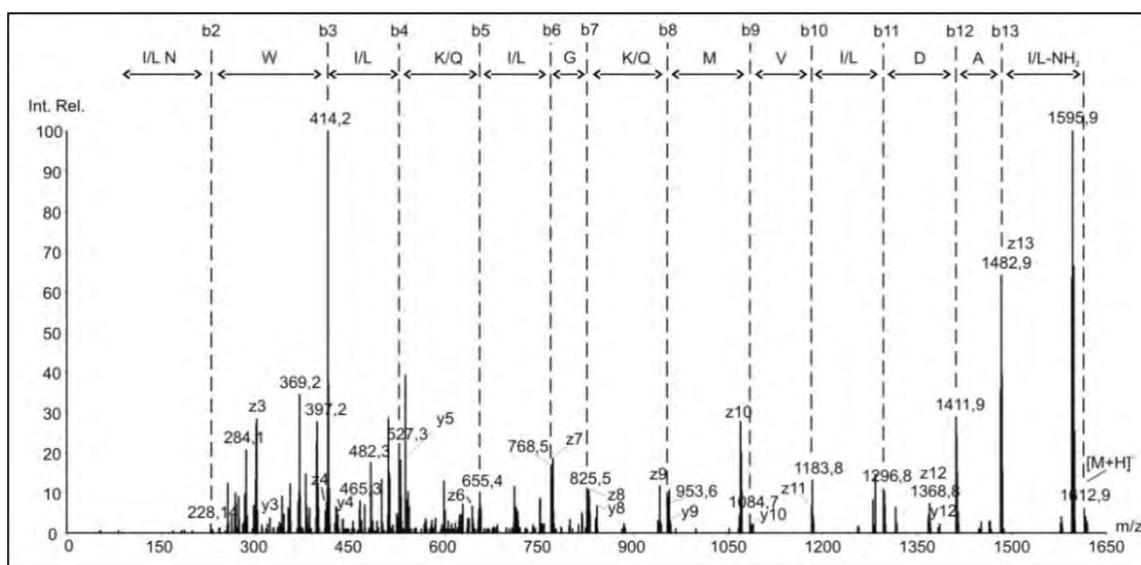


Figura 32: Espectro MS² deconvolvido, do peptídeo de massa molecular 1611,9 Da (fração 15). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 806,9 na forma de $[M+2H]^{2+}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir do íon molecular de m/z 1612,9 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

O espectro MS² do peptídeo presente na fração 15 está mostrado nas figuras 31 e 32, nas formas não deconvolvida e deconvolvida, respectivamente. Na figura 31 pode-se observar alguns íons com carga +2. Na figura 32 o íon molecular identificado foi o de m/z 1612,9 na forma $[M+H]^+$; a perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1595,9. Uma série completa de íons *b* pode ser observada no espectro: m/z 1482,9 (*b*₁₃), m/z 1411,9 (*b*₁₂), m/z 1296,8 (*b*₁₁), m/z 1183,8 (*b*₁₀), m/z 1084,7 (*b*₉), m/z 953,6 (*b*₈), m/z 825,5 (*b*₇), m/z 768,5 (*b*₆), m/z 655,4 (*b*₅), m/z 527,3 (*b*₄), m/z 414,2 (*b*₃) e m/z 228,1 (*b*₂). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo, com algumas pequenas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1611,9 Da, levando em consideração as séries de íons *b*, *y* e *z* foi: **I/L N W I/L K/Q I/L G K/Q M V I/L D A I/L**. A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência completa para o peptídeo presente na fração 15 é a seguinte: **I/L N W I/L K/Q I/L G K/Q M V I/L D A I/L-NH₂**

Esse peptídeo já foi identificado no veneno de *P. paulista* por de Souza e colaboradores (2009), sendo denominado “Polybia-MP-II” com sequência: INWLKLGKMVIDAL-NH₂. O peptídeo é um potente desgranulador de mastócitos com alta atividade hemolítica, porém não quimiotático e apresenta alta similaridade de sequência primária em relação à protonectina, um mastoparano descrito no veneno da vespa *Protonectarina sylveirae* (DE SOUZA, 2002).

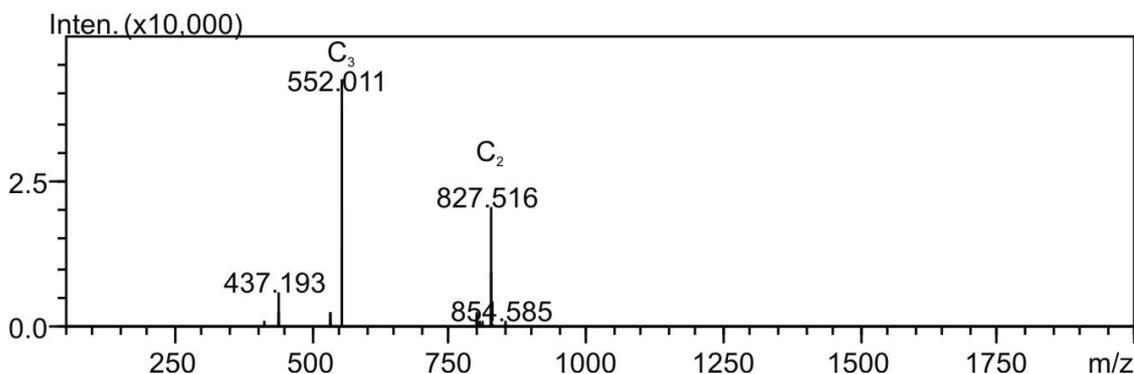


Figura 33: Espectro MS¹ do peptídeo de massa molecular 1653,0 Da e tempo de retenção de 36,5-37,4 minutos (fração 13). Os íons de *m/z* 552,0 (C₂) e 827,5 (C₃) correspondem ao íon-molecular do peptídeo na forma [M+2H]⁺² e [M+3H]⁺³, respectivamente.

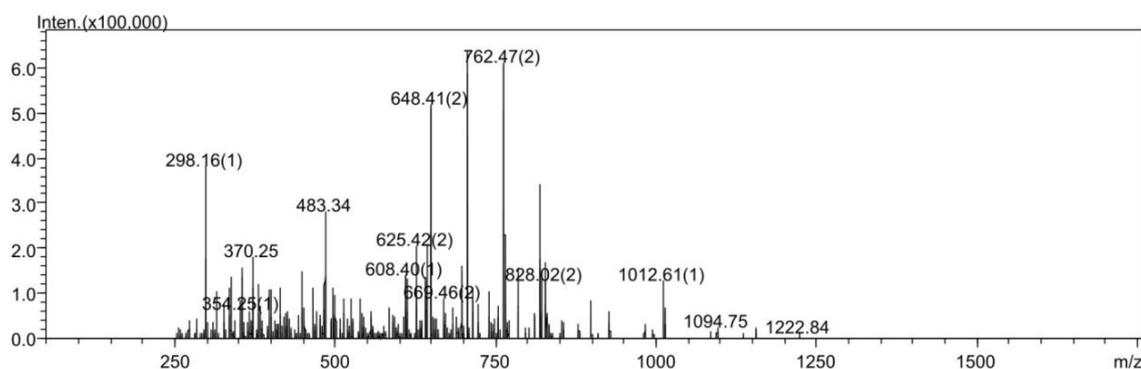


Figura 34: Espectro MS² não deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1653,0 Da (fração 13). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de *m/z* 827,5 na forma de [M+2H]⁺², sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo

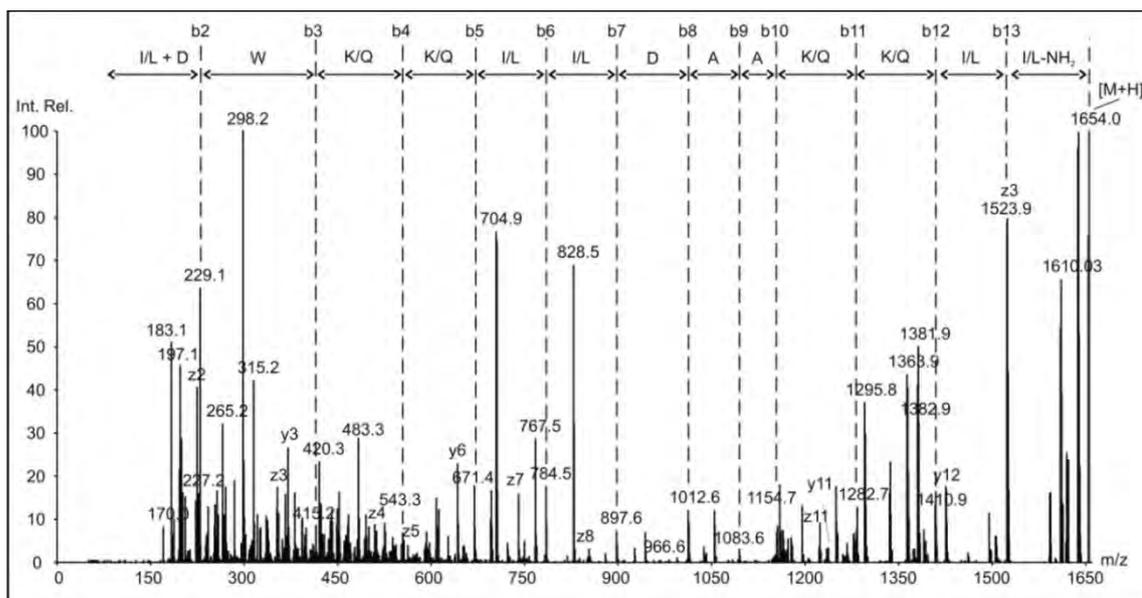


Figura 35: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1653,0 Da (fração 13). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 827,5 na forma de $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir do íon molecular de m/z 1654,0 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

Um dos peptídeos já conhecidos do veneno de *P. paulista* foi observado na fração 13, eluído com tempo de retenção de 36,5-37,4 minutos; este peptídeo é caracterizado pelo íon de m/z 552,01 e 827,51 nas formas de $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente. (Figura 33). O espectro MS² deste componente está mostrado nas figuras 34 e 35, nas formas não deconvolvida e deconvolvida, respectivamente. A figura 34 mostra vários íons-fragmentos com carga +2. Na Figura 35 o íon-precursor foi o de m/z 1654,0 na forma $[M+H]^+$. A perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1637,0. Uma série completa de íons do tipo *b* pode ser observada no espectro: m/z 1523,9 (*b*₁₃), m/z 1410,9 (*b*₁₂), m/z 1282,7 (*b*₁₁), m/z 1154,7 (*b*₁₀), m/z 1083,6 (*b*₉), m/z 1012,6 (*b*₈), m/z 897,6 (*b*₇), m/z 784,5 (*b*₆), m/z 671,4 (*b*₅), m/z 543,3 (*b*₄), m/z 415,2 (*b*₃) e m/z 229,1 (*b*₂). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo, com algumas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1653,0 Da, levando em consideração as séries de íons *b*, *y* e *z* foi: **I/L D W K/QK/Q I/L I/L D A A K/Q K/Q I/L I/L**. A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte:

I/L D W K/Q K/Q I/L I/L D A A K/Q K/Q I/L I/L-NH₂.

Esse peptídeo já havia sido identificado por de Souza e colaboradores (2005) no veneno de *P. paulista*, sendo denominado “Polybia-MP-I” com a sequência

IDWKLLDAAKQIL_{-NH₂}. Este peptídeo possui alta atividade desgranuladora de mastócitos, porém atividade hemolítica extremamente baixa, sugerindo que esse peptídeo deva promover a desgranulação de mastócitos por interação com proteínas G, ao nível da membrana plasmática (DE SOUZA, 2002).

Através do uso de espectros de massas obtidos em condições de *CID*, seguidos da deconvolução e interpretação dos mesmos, para peptídeos com sequências previamente conhecidas para o veneno de *P. paulista* (Polybia-CP, Polybia-MPI e Polybia-MPII), foi possível estabelecer uma rotina para interpretar espectros de peptídeos ainda desconhecidos do veneno de *P. paulista*. O mesmo processo utilizado para sequenciar os três peptídeos acima, também foi utilizado para os peptídeos novos, porém os espectros não deconvoluídos destes peptídeos não foram representados para facilitar e simplificar a apresentação dos dados; desta maneira, para os peptídeos desconhecidos foram apresentados somente os espectros na forma deconvoluída para a forma monoprotionada e interpretada.

Dentre os novos peptídeos estudados, somente aqueles com as sequências primárias completas e confirmadas estão sendo apresentados neste trabalho. Estes peptídeos foram escolhidos pela qualidade de seus espectros *CID*, possibilitando desta forma a obtenção de sequências primárias confiáveis.

Nas três amostras analisadas (A, B e C), uma fração bem abundante do cromatograma de íons totais do veneno de *P. paulista* é a de número 6 (Figura 24). Nesta fração foram encontradas três massas moleculares diferentes, representadas com as letras D, E e F no espectro MS¹ referente ao tempo de retenção de 21,4-22,7 minutos (Figura 36).

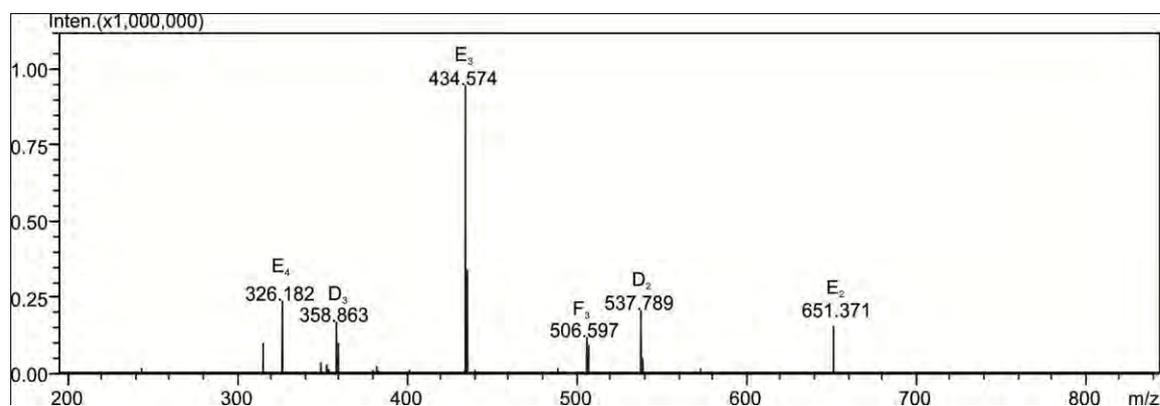


Figura 36: Espectro de MS¹ referente à fração 6 do cromatograma de íons totais da amostra A. Os peptídeos apresentaram tempo de retenção de 21,4-22,7 minutos. Os íons de m/z 537,8 (D₂) e 358,9 (D₃) correspondem ao peptídeo de massa molecular 1073,5 Da na forma $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente; os íons de m/z 651,4 (E₂), 434,5 (E₃) e 326,2 (E₄) correspondem ao íon molecular do peptídeo de massa molecular 1300,7 Da na forma $[M+2H]^{+2}$, $[M+3H]^{+3}$ e $[M+4H]^{+4}$ respectivamente. O íon de m/z 506,6 (F₃) corresponde ao íon molecular do peptídeo de massa molecular 1516,8 Da na forma $[M+3H]^{+3}$.

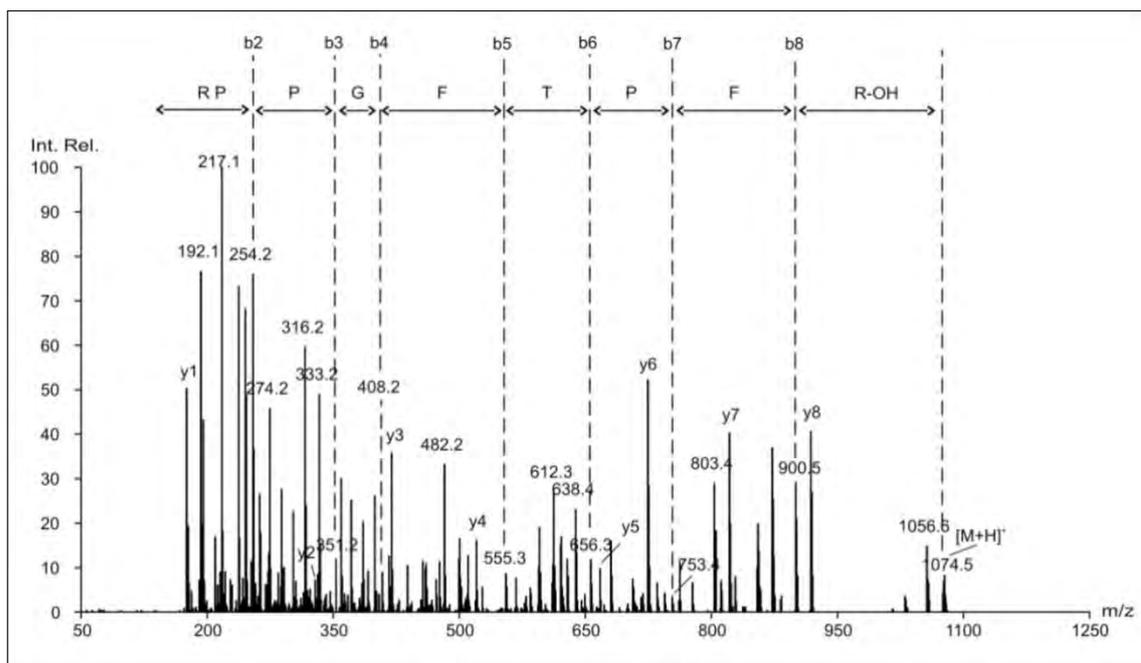


Figura 37: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1073,5 Da (fração 6). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 537,8 na forma $[M+2H]^{2+}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 1074,5, na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

O íon molecular identificado foi o de m/z 1074,5 na forma $[M+H]^+$ (Figura 37); a perda de água (18 Da) a partir do íon molecular, resultou no íon de m/z 1056,6. Uma série completa de íons b pode ser observada no espectro: m/z 900,5 (b_8), m/z 753,4 (b_7), m/z 656,3 (b_6), m/z 555,3 (b_5), m/z 408,2 (b_4), m/z 351,2 (b_3) e m/z 254,2 (b_2). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a determinação da sequência do peptídeo.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1073,5 Da, levando em consideração as séries de íons b e y foi: **R P P G F T P F R** (Figura 37). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma de ácido livre; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte: **R P P G F T P F R_{OH}**.

Este peptídeo pertence à classe das neurocininas, sendo denominado Thr6-Bradicinina (MORTARI et al., 2006). A primeira descrição dessa molécula em venenos de vespas foi em *Polistes rothneyiwatai*, há 35 anos (WATANABE et al., 1976); posteriormente, também foi descrito no veneno da vespa solitária *Megascolia flavifrons* (YASUHARA et al., 1987), porém este peptídeo ainda não havia sido descrito no veneno da vespa social *P. paulista*.

A neurocinina Thr6-BK apresenta uma alta similaridade com a bradicinina (BK), com exceção da substituição do resíduo de Ser na BK, por Thr na Thr6-BK, na posição seis; em decorrência disso, há pequenas modificações em sua estrutura secundária (PELEGRINI et al., 1997). Essa modificação tem sido indicada como responsável pelo aumento da afinidade pelo

receptor B2, e da potência da Thr6-BK em relação à BK, em investigações *in vitro* (PELEGRINI et al., 1997; PELEGRINI; MIERKE, 1997).

A bradicinina causa vasodilatação, ou seja, aumento do calibre dos vasos sanguíneos devido ao relaxamento das fibras musculares lisas que constituem suas paredes. Assim, o fluxo sanguíneo aumenta e a pressão arterial é reduzida (CONLON; ARONSSON, 1997; CONLON, 1999; FERNANDEZ et al., 2004). Esse peptídeo também pode contrair o tecido muscular liso em alguns órgãos, bem como em alguns mamíferos, contrair o músculo bronquial mais lentamente que a histamina. Ainda em mamíferos, a produção de BK resulta em vasodilatação, que ocorre pela diminuição da resistência arteriolar, aumento da permeabilidade vascular, promove broncoconstrição, induz contração dos músculos lisos gastrointestinais e uterino, estimula a secreção eletrolítica pelos rins, promove a ativação primária dos neurônios sensoriais (ou sensoriais) aferentes, estimula a liberação de citocinas e possivelmente possui efeito mitogênico. Além disso, a bradicinina têm sido amplamente associada a vários outros processos fisiológicos, como respostas inflamatórias e indução de noceção e hiperalgesia.(CALIXTO et al., 2000).

O peptídeo “E” possui massa molecular 1300,7 Da e é o peptídeo que possui maior intensidade no espectro de MS¹ da fração 6 do veneno de *P. paulista*. Abaixo segue o espectro MS² deconvoluído obtido através da fragmentação do íon de m/z 651,371 correspondente ao peptídeo 1300,7 Da na forma $[M+2H]^{+2}$ (Figura 38).

O íon molecular identificado foi o de m/z 1301,7 na forma $[M+H]^+$, e a perda de H₂O (18 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1283,7. Uma série completa de íons *b* pode ser observada no espectro: m/z 1127,6 (b_{10}), m/z 980,5 (b_9), m/z 883,5 (b_8), m/z 782,4 (b_7), m/z 635,4 (b_6), m/z 578,3 (b_5), m/z 481,3 (b_4), m/z 384,3 (b_3), m/z 228,1 (b_2) e m/z 157,1 (b_1). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo.

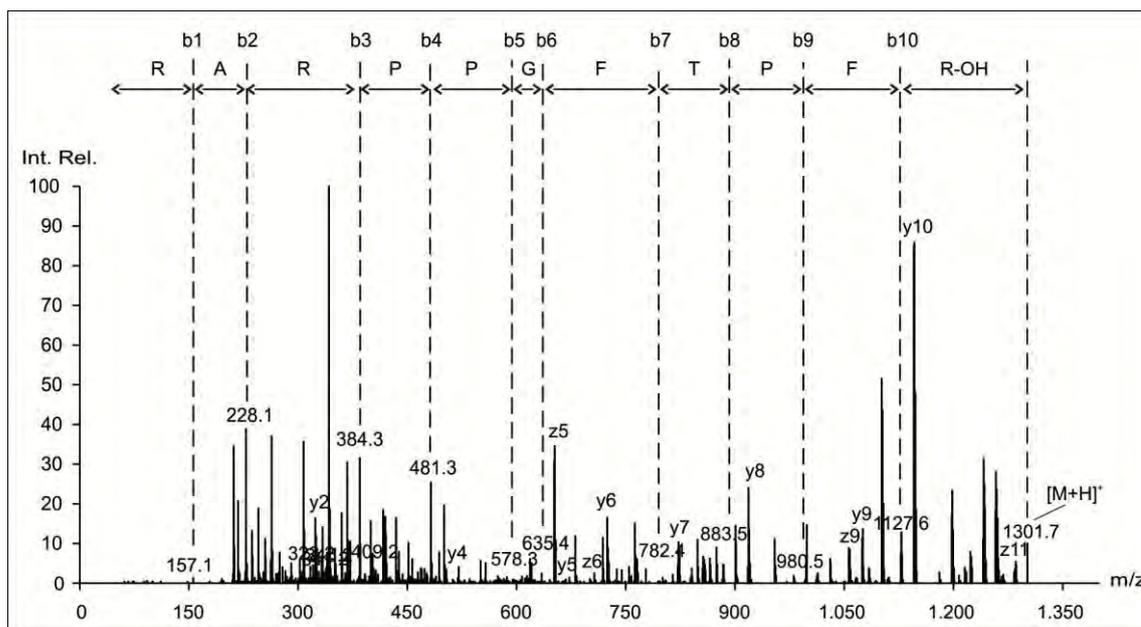


Figura 38: Espectro MS^2 deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1300,7 Da (fração 6). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 651,3 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 1301,7 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1300,7 Da foi:

R A R P P G F T P F R (Figura 38). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma de ácido livre; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte: **R A R P P G F T P F R-OH**.

Esta sequência é bastante similar à do peptídeo de massa 1073,5Da (Figura 37), sendo que suas propriedades foram testadas e avaliadas neste projeto (Parte III), possibilitando o conhecimento de seu papel funcional no veneno da vespa. Aparentemente, trata-se de outra neurocinina.

Ainda na fração 6 um outro peptídeo foi encontrado, e designado no espectro MS^1 como peptídeo “F”. Este peptídeo, de massa molecular 1516,8 Da, também foi estudado e seu sequenciamento foi realizado pela obtenção do espectro MS^2 , selecionando como precursor o íon de m/z 506,6 na forma $[M+3H]^{+3}$ (Figura 36). O espectro MS^2 deconvolvido, para a forma de íons monoprotonados está representado na figura 39.

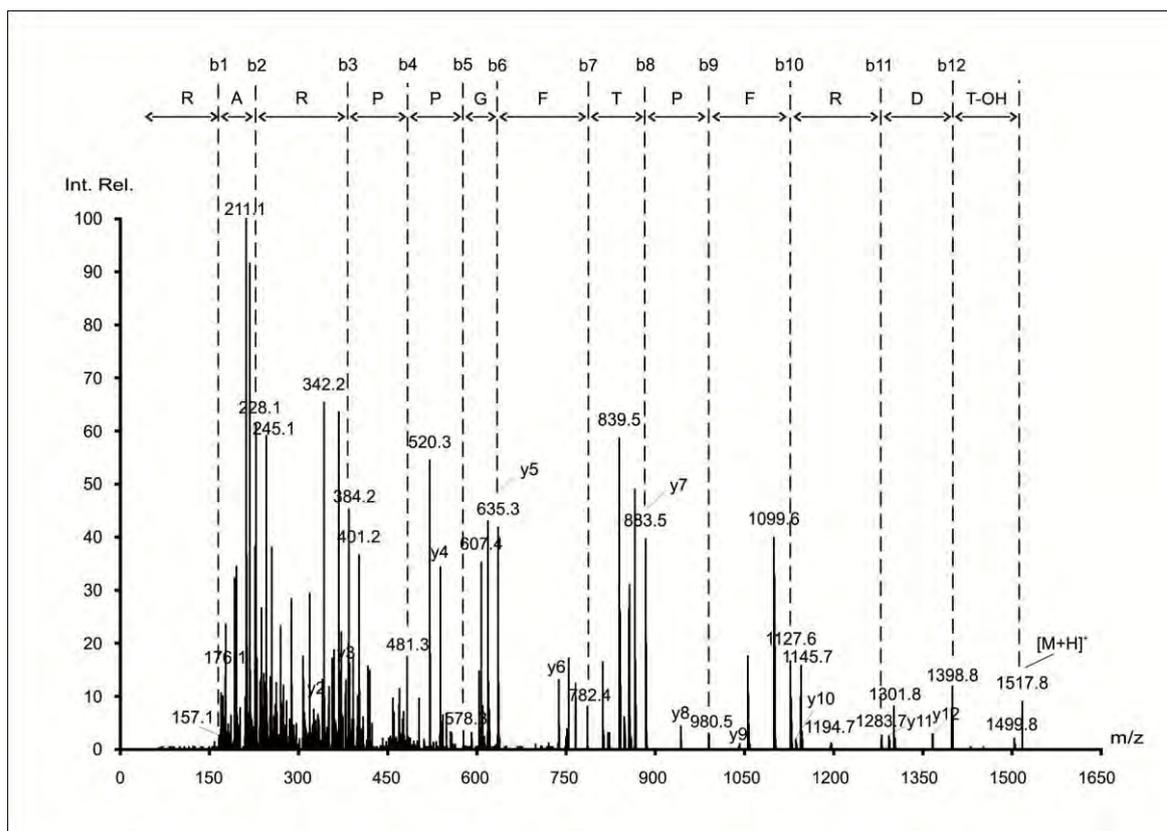


Figura 39: Espectro MS^2 deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1516,8 Da (fração 6). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 506,6 na forma $[M+3H]^{3+}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 1517,8, na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

O íon molecular identificado no espectro foi de m/z 1517,8 na forma $[M+H]^+$; a perda de água (18 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1499,8. Uma série completa de íons b pode ser observada no espectro: m/z 1398,8 (b_{12}), m/z 1283,7 (b_{11}), m/z 1127,6 (b_{10}), m/z 980,5 (b_9), m/z 883,5 (b_8), m/z 782,4 (b_7), m/z 635,4 (b_6), m/z 578,3 (b_5), m/z 481,3 (b_4), m/z 384,3 (b_3), m/z 228,1 (b_2) e m/z 157,1 (b_1). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a determinação da sequência do peptídeo.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1517,8 Da, levando em consideração as séries de íons b e y foi: **R A R P P G F T P F R D T** (Figura 39). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma de ácido livre; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte: **R A R P P G F T P F R D T-OH**.

Este peptídeo apresentou grande semelhança com os outros dois peptídeos encontrados e estudados na mesma fração do cromatograma de íons totais (1073,5 Da e 1300,7 Da).

Os três peptídeos isolados (“D”, “E” e “F”) no mesmo tempo de retenção, referente à fração 6 tiveram um trecho de sequência comum (ou seja, mesma sequência de resíduos

aminoácidos): R P P G F T P F R. Esta sequência de resíduos de aminoácidos corresponde justamente ao peptídeo Thr6-bradicinina, isolado em outros venenos de vespas (Tabela 2), conforme já discutido acima.

Tabela 2: Cinininas descritas em trabalhos anteriores e os peptídeos com características similares isolados do veneno de *Polybia paulista* neste trabalho.

| <u>ESPÉCIE</u> | <u>PEPTÍDEO</u> | <u>SEQUÊNCIA PRIMÁRIA</u> |
|---------------------------------|-----------------------|--|
| <i>Polistes</i> | Polistescinina-3 | P E T N K K K L R G R P P G F S P F R _{-NH2} |
| <i>Polistes</i> | Polistescinina-R | A R R P P G F T P F R _{-NH2} |
| <i>Polistes</i> | Polistescinina-J | R R R P P G F S P F R _{-NH2} |
| <i>Polistes</i> | Polistescinina-C | S K R P P G F S P F R _{-NH2} |
| <i>Polistes</i> | Polistes-protonectina | I L S A L L G L L K S L _{-NH2} |
| <i>Protopolybia exigua</i> | Polybiacianina-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> | Polybiacianina-II | D K N K K P I W M A G F P 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 _{-NH2} |
| <i>Vespa</i> | Vespacinina-X | A R P P G F S P F R I V _{-NH2} |
| <i>Vespa</i> | Vespacinina-A | G R P P G F S P F R V I _{-NH2} |
| <i>Vespa</i> | Vespacinina | T G R P X G F S P F R V V _{-NH2} |
| <i>Chiphononix fulvognathus</i> | Thr6-Bradicinina | R P P G F T P F R _{-NH2} |
| <i>Chiphononix fulvognathus</i> | Fulvocinina | S I V L R G K A P F R _{-NH2} |
| <i>Chiphononix fulvognathus</i> | Cyphoscinina | D T R P P G F T P F R _{-NH2} |

NEUROKININAS ENCONTRADAS

| | | |
|-------------------------|----------------|--|
| <i>Polybia paulista</i> | Thr6-BK | R P P G F T P F R _{-OH} |
| <i>Polybia paulista</i> | RA_ Thr6_BK | R A R P P G F T P F R _{-OH} |
| <i>Polybia paulista</i> | RA_ Thr6-BK_DT | R A R P P G F T P F R D T _{-OH} |

KISHIMURA et al., 1976; MENDES; PALMA 2006; MURATA et al., 2006, NAKAJIMA et al., 1986; PICOLO et al., 2010; ROCHA et al., 1949; UENO et al., 1977; UNDEFRIEND et al., 1967; YASUHARA et al., 1977; YASUHARA et al., 1983; WATANABE et al., 1976.

Diferentes análogos de bradicininas (denominadas BPPs – peptídeos potenciadores de bradicinina) vêm sendo isolados em venenos animais (CONCEIÇÃO et al., 2007), como formigas, abelhas, serpentes, sapos e aranhas (FERREIRA et al., 1998; MARANGONI et al., 1993; MATHIAS; SCHACHTER, 1958; PIEK et al., 1991; PIEK et al., 1997; SCHACHTER, 1968). Estas moléculas têm atraído grande interesse dos pesquisadores, sendo que vários trabalhos tem focado principalmente o conhecimento da estrutura-função destes componentes.

Este fato despertou um grande interesse no estudo destes dois novos peptídeos, visando explorar as atividades biológicas, a fim de entender os mecanismos de ação dos mesmos. Esses dois peptídeos junto com a Thr6-BK (Figura 37) tiveram suas atividades biológicas avaliadas, as quais estão apresentadas na parte III dos resultados e discussão.

Apesar de não representado por nenhuma fração do cromatograma de íons totais da amostra A (Figura 24), no tempo de retenção de 34,1-34,5 minutos foi identificado um novo peptídeo de massa molecular 1039,7 Da. Este peptídeo, identificado neste texto pela letra “G” (Figura 40), foi observado como íon de m/z 520,8 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo este o íon

molecular selecionado como precursor para a fragmentação; o espectro de MS² deconvolvido está representado na figura 41.

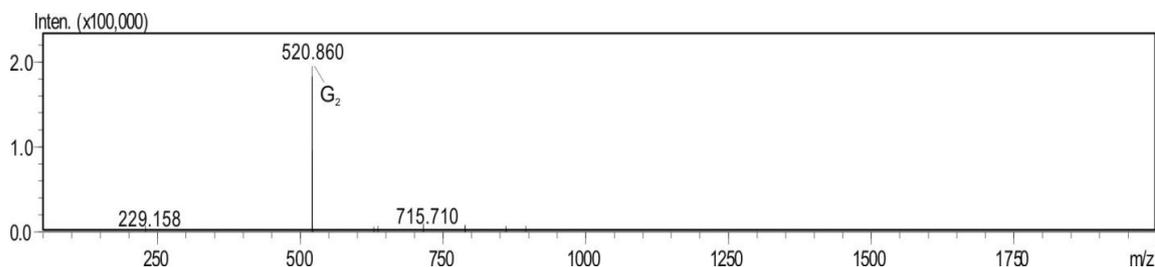


Figura 40: Espectro de MS¹ referente ao tempo de retenção de 34,1-34,5 minutos do cromatograma de íons totais da amostra A. O íon de m/z 520,8 (G_2) corresponde ao íon molecular na forma $[M+2H]^{+2}$.

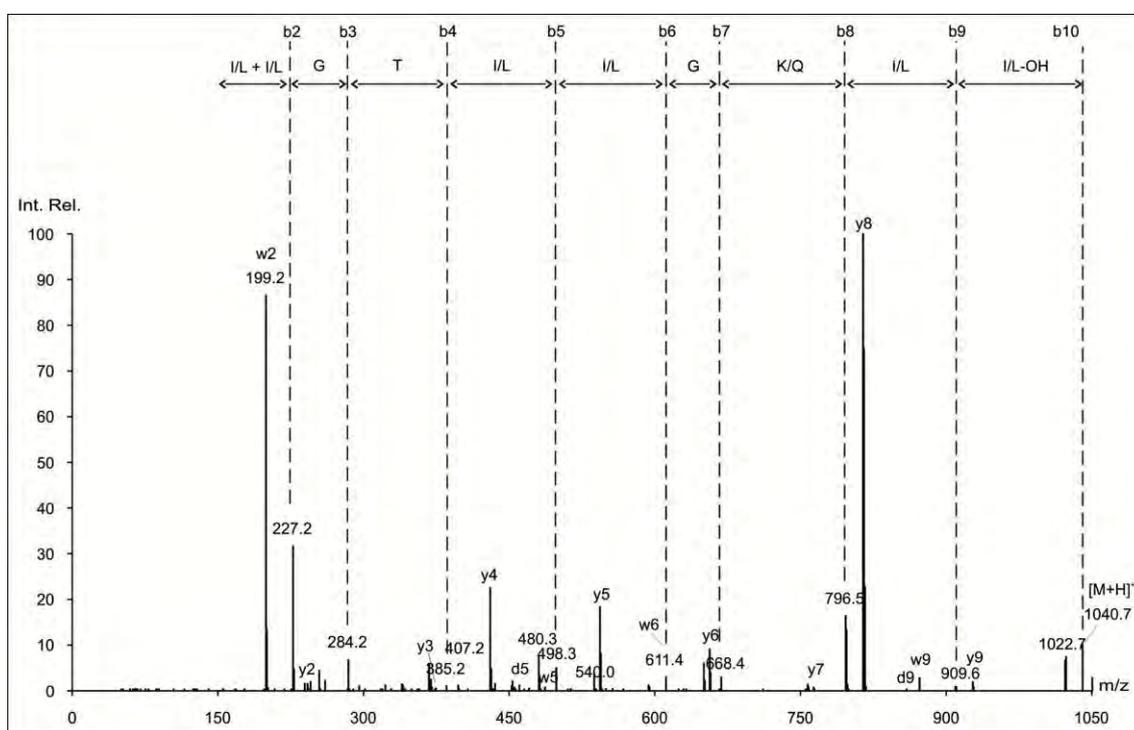


Figura 41: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1039,7 Da (34,1-34,5 minutos). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 520,8 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 1040,7 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

O íon molecular foi identificado no espectro como sendo o íon de m/z 1040,7 na forma $[M+H]^+$; a perda de água (18 Da) à partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1022,7 (Figura 41). Uma série completa de íons b pode ser observada no espectro: m/z 909,6 (b_9), m/z 796,5 (b_8), m/z 668,4,4 (b_7), m/z 611,4 (b_6), m/z 498,3 (b_5), m/z 385,2 (b_4), m/z 284,2 (b_3) e m/z 227,1 (b_2). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a

determinação da sequência do peptídeo, com algumas pequenas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q.

A distinção entre os resíduos de I e L pode ser realizada através da observação dos fragmentos iônicos do tipo *d* e/ou *w* com a utilização de alta energia de colisão durante a obtenção dos 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 *d* e/ou *w*. Por exemplo, os íons do tipo *d* correspondem à clivagem α da cadeia lateral do resíduo de aminoácido C-terminal. Aqueles do tipo *w* também podem ser formados nesse processo, se a posição do resíduo de I for adjacente ao sítio de clivagem no esqueleto de carbonos α da cadeia peptídica. Neste caso, a massa molecular desses íons será 14 Da maior em relação à fragmentação da cadeia lateral do resíduo de L (MENDES et al., 2004a).

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*. Fragmentações simuladas também foram criadas 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 das sequências possíveis encontradas. Em seguida, essas sequências simuladas foram comparadas 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 I e L nas posições N- e C-terminais de cada peptídeo permanecem, uma vez que quando estes resíduos de amino ácidos se localizam nas posições terminais, não ocorrem fragmentações das cadeias laterais (MENDES et al. 2004b).

Assim, no presente trabalho esse método de investigação dos íons *d* e *w* para distinguirmos os resíduos I/L foi utilizada dentro da sequência polipeptídica, porém os resíduos de I e L que se encontravam nas posições N- ou C-terminais não foram possíveis de serem resolvidas.

A sequência determinada para o peptídeo de massa molecular 1039,7 Da (34,1-34,5 minutos), utilizando-se principalmente das séries *b* e *y* e das séries *d* e *w* para distinção dos resíduos de aminoácidos I e L foi: I/L I/L G T I/L I/L G K/Q I/L I/L (Figura 41). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma de ácido livre. A distinção dos resíduos I e L dentro da cadeia peptídica foi possível pela presença dos íons: m/z 456,3 (d_5), m/z 853,6 (d_9), m/z 484,3 (w_5), m/z 611,4 (w_6) e m/z 868,5 (w_6).

Portanto, a sequência completa para o peptídeo 1039,7 Da, levando em consideração as séries de íons *b* e *y* é a seguinte: **I/L L G T I L G K/Q I I/L-OH**

Esta sequência é bem similar à do peptídeo “Polybia-CP”, já conhecido do veneno *P. paulista*. O peptídeo Polybia-CP apresenta também grande homologia em relação à pronectina, um peptídeo desgranulador de mastócitos do veneno da vespa *P. sylveirae*. As atividades desgranuladora de mastócitos e hemolítica do Polybia-CP são extremamente baixas, porém este peptídeo apresenta alta atividade quimiotática e antibiótica (DE SOUZA et al., 2005).

Assim, o estudo futuro deste novo peptídeo isolado trará maiores informações sobre as características destas moléculas presentes no veneno de *P. paulista*, sugerindo ainda que este peptídeo, pela semelhança em sua estrutura primária com outros peptídeos, possa ser um peptídeo quimiotático.

O espectro MS¹ da fração 16 (41,2-41,9 minutos) revelou a presença do peptídeo Polybia-CP já discutido acima (Figura 29), e também de um novo peptídeo caracterizado pelo íon de *m/z* 631,42 (H₂), na forma de [M+2H]⁺² (Figura 42). Seu espectro de MS² deconvoluído está representado na figura 43.

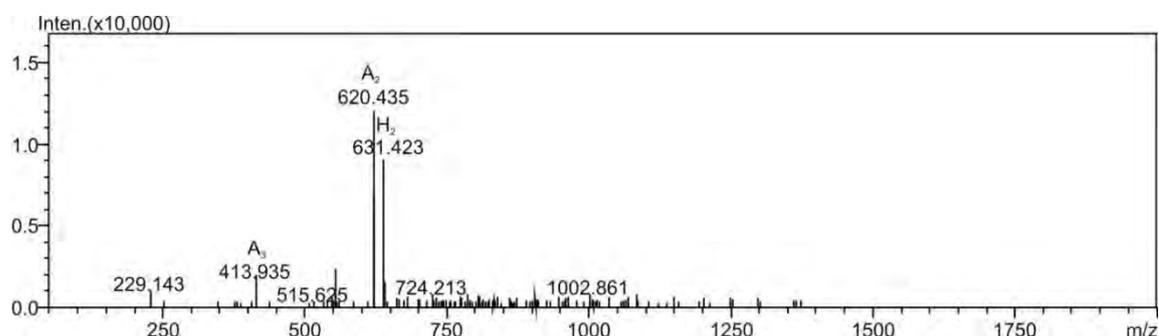


Figura 42: Espectro MS¹ da fração 16 (41,2-41,9 minutos); o íon de *m/z* 620,4(A₂) e 413,9 (A₃) correspondem ao peptídeo Polybia-CP (1238,8 Da) na forma [M+2H]⁺² e [M+3H]⁺³, respectivamente, enquanto que o íon de *m/z* 631,4 (H₂) corresponde ao peptídeo de massa molecular 1260,8 Da, na forma de [M + 2H]⁺².

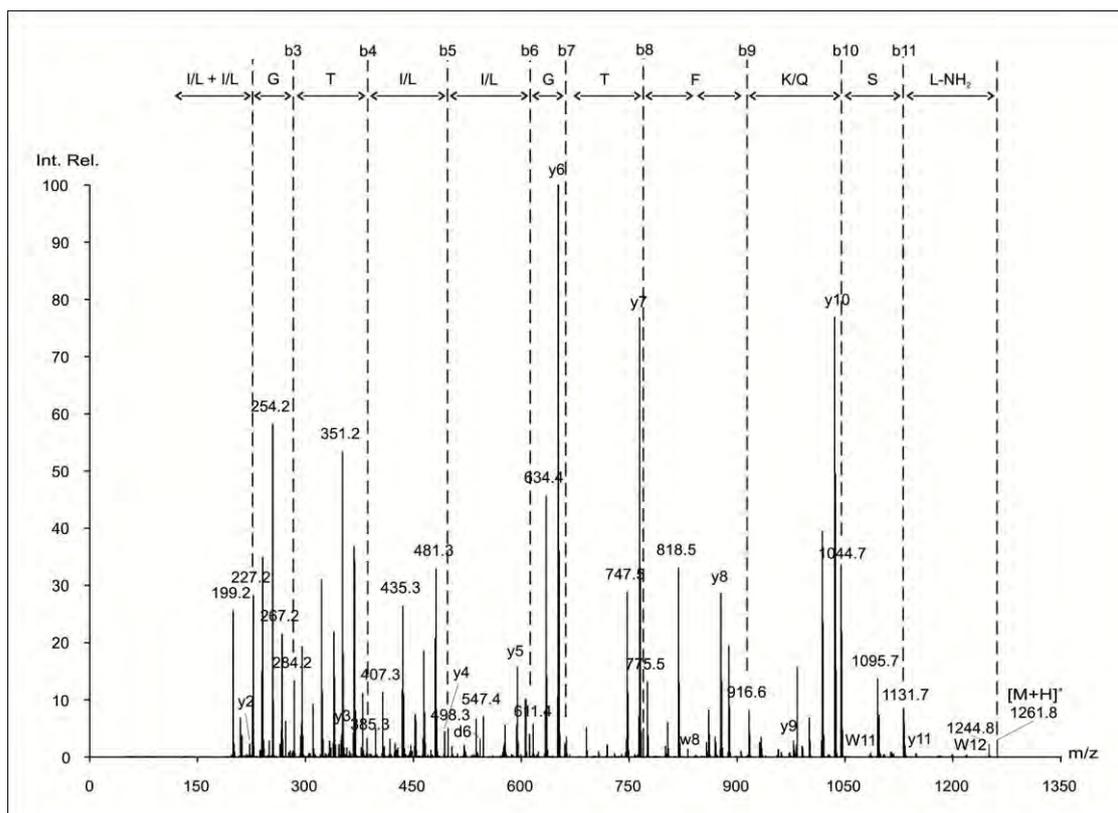


Figura 43: Espectro MS²deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1260,8 Da (fração16). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 631,4 na forma $[M+2H]^{2+}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir do íon molecular de m/z 1261,8 na forma $[M + H]^+$, bem como sua interpretação.

O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 43) como sendo o íon de m/z 1261,8 na forma $[M+H]^+$; a perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1244,8. Uma série completa de íons *b* pode ser observada no espectro: m/z 1131,7 (b_{11}), m/z 1044,7 (b_{10}), m/z 916,6 (b_9), m/z 769,5 (b_8), m/z 668,5 (b_7), m/z 611,4 (b_6), m/z 498,3 (b_5), m/z 385,3 (b_4), m/z 284,2 (b_3) e m/z 227,2 (b_2). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1260,8 Da, levando em consideração as séries de íons *b* e *y* foi: I/L I/L G T I/L I/L G T F K/Q S I/L (Figura 43). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma amidada. A distinção dos resíduos I e L dentro da cadeia peptídica foi possível pela presença dos íons: m/z 541,3 (d_6), m/z 832,5 (w_8) e m/z 1089,6 (w_{11}). Portanto, a sequência completa para o peptídeo de 1260,8 Da é a seguinte:



Esta sequência, como no caso do peptídeo 1039,7 Da (Figura 41) é bem semelhante à sequência primária do peptídeo “Polybia-CP” (ILGTILGLLKSL-NH₂; Figura 29), sendo que a

síntese, e o ensaio de suas atividades biológicas no futuro, poderão estabelecer se há semelhanças na atividade e função destes novos peptídeos isolado do veneno de *P. paulista* com os peptídeos da mesma família já conhecidos.

Além dos dois últimos peptídeos encontrados que se assemelham ao peptídeo “Polybia-CP”, um terceiro peptídeo pertencente à mesma família também foi encontrado na fração 8 com tempo de retenção de 26,4-27,6 minutos, apresentando massa molecular de 628,4 Da. Este peptídeo foi fragmentado a partir do íon de m/z 629,426 na forma $[M+H]^+$ (Figura 44); seu espectro de MS^2 deconvoluído está representado na figura 45.

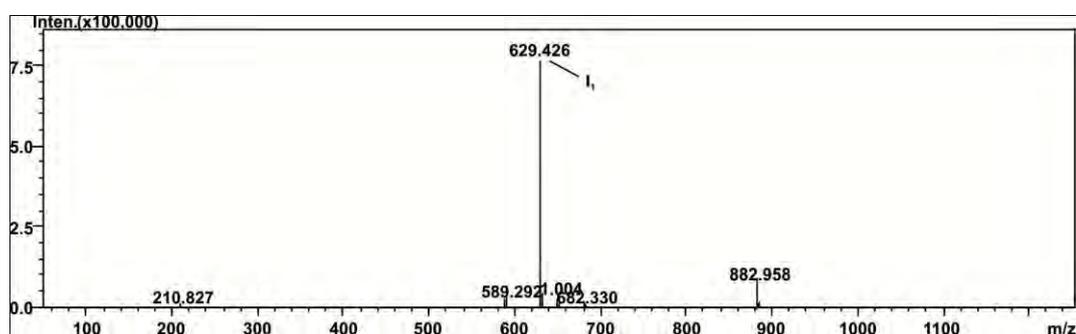


Figura 44: Espectro MS^1 da fração 8 (26,4-27,6 minutos). O íon molecular de m/z 629,4 na forma $[M+H]^+$ (I_1) corresponde ao peptídeo de massa molecular 628,4Da.

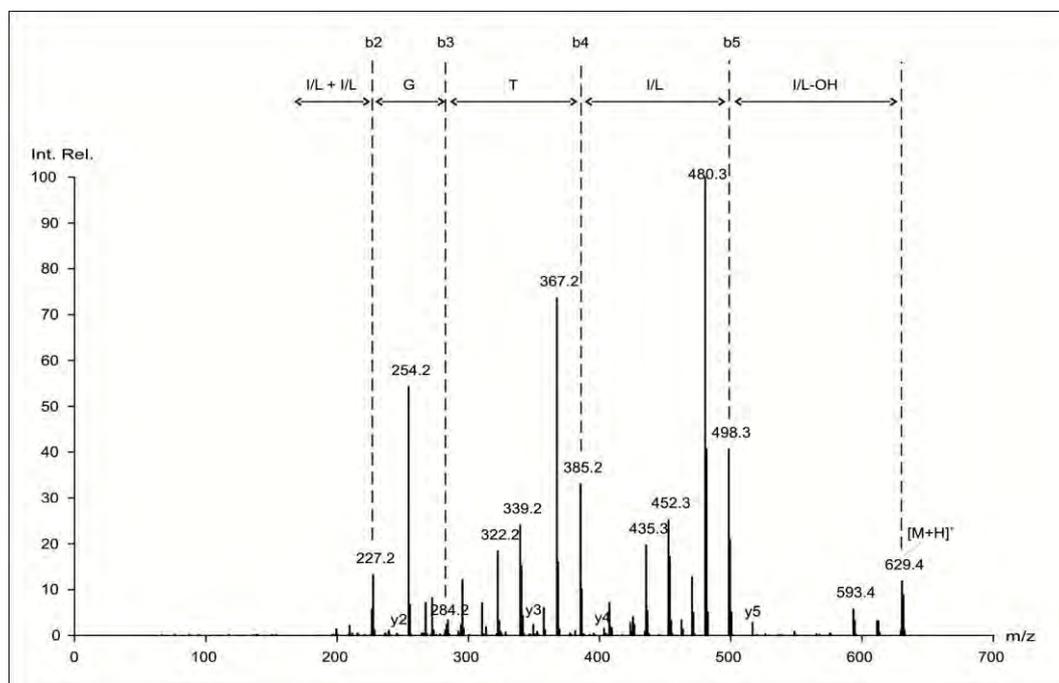


Figura 45: Espectro MS^2 deconvoluído do peptídeo de massa molecular 628,4 Da (fração 8). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 629,4 na forma $[M+H]^+$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir do íon molecular, bem como sua interpretação.

O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 45) como sendo o íon de m/z 629,4 na forma $[M+H]^+$; a perda de água (18 Da) à partir do íon molecular resultou no íon de m/z 611,4 (Figura 28). Uma série completa de íons b pode ser observada no espectro: m/z 498,3 (b_5), m/z 385,2 (b_4), m/z 284,2 (b_3) e m/z 227,1 (b_2). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a determinação da sequência do peptídeo, com algumas pequenas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 629,4 Da, levando em consideração as séries de íons b e y , foi: **I/L I/L G T I/L I/L** (Figura 45). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma de ácido; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte: **I/L I/L G T I/L I/L-OH**.

Para o peptídeo acima não foi possível a localização dos íons d e w a fim de distinguir os resíduos de I e L no meio da cadeia. Procurando na literatura, esse peptídeo já era conhecido de outros venenos animais e 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). Além disso, essa sequência é a mesma já descrita para o peptídeo Protonectina (1-6) descrito por Baptista-Saidemberg e colaboradores (2010).

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).

A tabela 3 demonstra sequências de peptídeos quimiotáticos em comparação com os novos peptídeos encontrados neste trabalho:

Tabela 3: Peptídeos quimiotáticos descritos em trabalhos anteriores e os novos peptídeos com características similares isolados do veneno de *Polybia paulista* neste trabalho.

Peptídeos quimiotáticos descritos em trabalhos anteriores:

ILGTILGLLKSL_{NH2} / Polybia-CP (DE SOUZA et al., 2005)

ILGTILGLLKGL_{NH2} / Protonectina (MENDES et al., 2004b)

ILGTIL_{NH2} / Protonectina (DOHTSU et al., 1993)

FLPILGKILGGL_{NH2} / Ves-CP-T *

FLPILGKLLSGL_{NH2} / Ves-CP-M *

FLPMIAKLLGGL_{NH2} / Ves-CP-A *

FLPIIAKLLGGL_{NH2} / Ves-CP-X *

FLPIIAKLVSGGL_{NH2} / Ves-CP-L *

IVPFLGPLLGLLT_{NH2} / Icaria-CP *

FLPLILRKIVTAL_{NH2} / Crabrolina *

FLPLILGKLVKGL_{NH2} / HRHII *

Peptídeos quimiotáticos novos:

I/LGTILGK/QIIL_{OH}

I/LGTILGTFK/QSIL_{NH2}

I/LI/LGTI/LI/L_{OH}

*NAKAJIMA, 1986.

No tempo de retenção de 44,1-44,5 minutos (fração 17) outro peptídeo teve sua sequência determinada. A sequência deste peptídeo de massa 1680,9 Da (Figura 46) foi determinada à partir da interpretação do espectro MS² (Figura 47) do íon de m/z 841,4 na forma $[M+2H]^{+2}$.

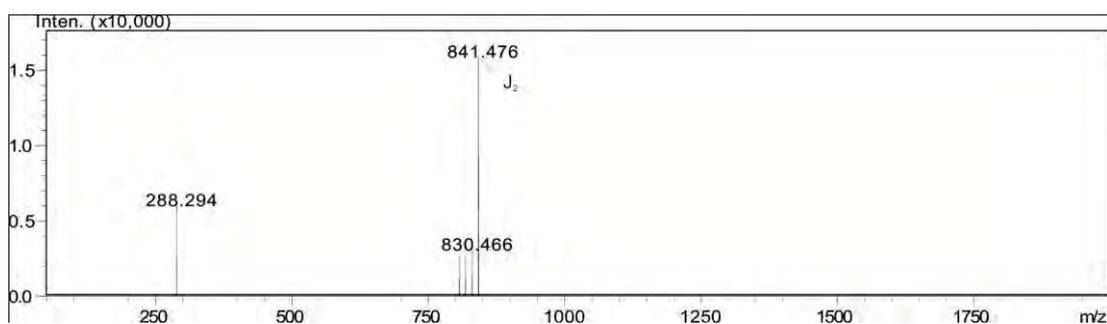


Figura 46: Espectro de MS¹ da fração 17 (44,1-44,5 minutos). O íon de m/z 841,4 (J₂) corresponde ao íon molecular na forma $[M+2H]^{+2}$ do peptídeo de massa molecular 1680,9 Da.

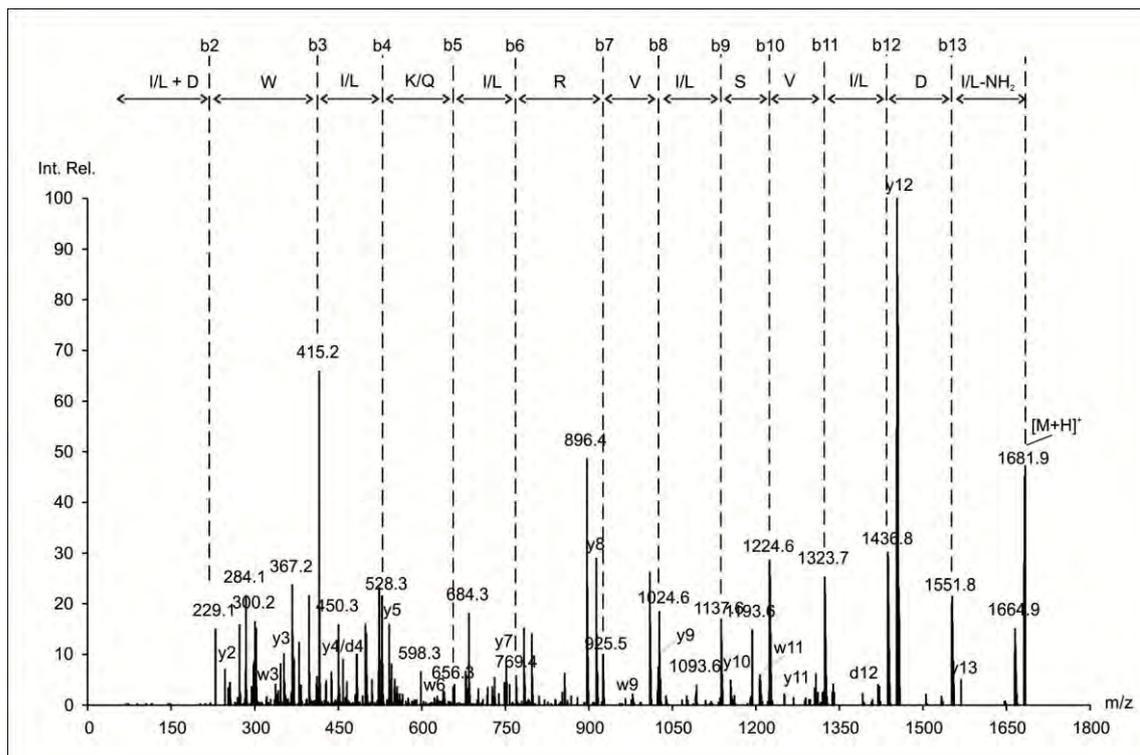


Figura 47: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1680,9 Da. Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 841,4 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir do íon molecular de m/z 1681,9 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 47) como sendo o íon de m/z 1681,9 na forma $[M+H]^+$; a perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1664,9. Uma série completa de íons *b* pode ser observada no espectro: m/z 1551,8 (b_{13}), m/z 1436,8 (b_{12}), m/z 1323,7 (b_{11}), m/z 1224,7 (b_{10}), m/z 1137,6 (b_9), m/z 1024,6 (b_8), m/z 925,5 (b_7), m/z 769,4 (b_6), m/z 656,3 (b_5), m/z 528,3 (b_4), m/z 415,2 (b_3) e m/z 229,1 (b_2). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1680,9 Da, levando em consideração as séries de íons *b* e *y* foi: **I/L D W I/L K/Q I/L R V I/L S V I/L D I/L** (Figura 47). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma amidada. A distinção dos resíduos I e L dentro da cadeia peptídica foi possível pela presença dos íons: m/z 458,2 (d_4), m/z 627,3 (w_6), m/z 967,5 (w_9) e m/z 1208,7 (w_{11}). Portanto, a sequência completa para o peptídeo de 1680,9 Da é a seguinte:



Na fração 15 (com tempo de retenção de 40-40,8 minutos) eluiu o peptídeo mastoparano Polybia-MPII de massa 1611,9 Da (já conhecido do veneno de *P. paulista*),

juntamente um novo peptídeo que teve sua sequência determinada no presente trabalho. Este novo peptídeo apresentou espectro MS¹ (figura 48) caracterizado pelo íon de m/z 817,97 na forma $[M+2H]^{+2}$. A sequência deste peptídeo de massa 1633,9 Da (Figura 48) foi determinada à partir da interpretação do espectro MS² (Figura 49) do íon de m/z 817,978.

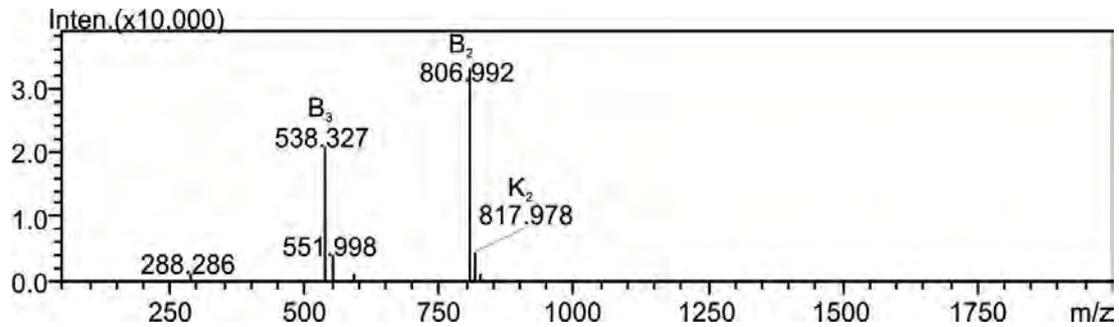


Figura 48: Espectro de MS¹ referente ao peptídeo de massa molecular 1633,9 Da, eluído no tempo de retenção de 40-40,8 minutos (fração 15). Os íons de m/z 806,99 (B_2) e 538,32 (B_3) correspondem aos íons moleculares do peptídeo Polybia-MP II (1611,9 Da) na forma $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente. O novo peptídeo é caracterizado pelo íon de m/z 817,97 na forma $[M+2H]^{+2}$, representado por K_2 .

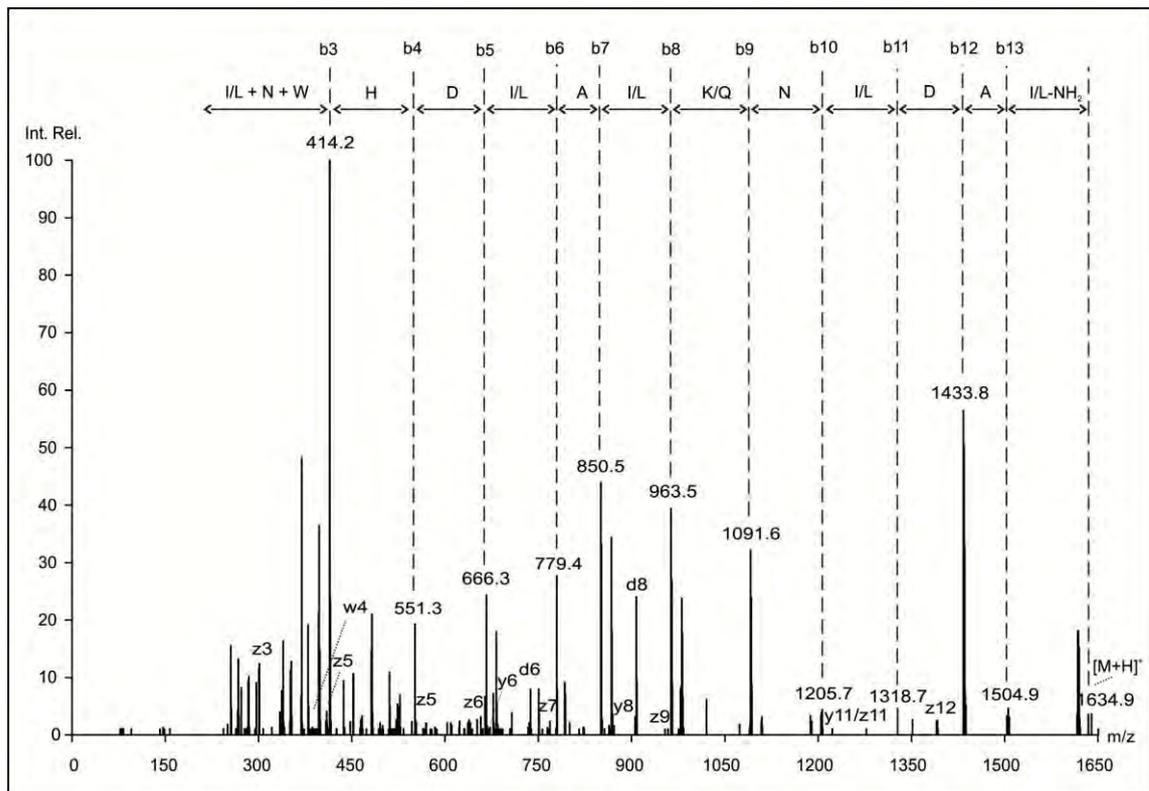


Figura 49: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1633,9 Da (Fração 15). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 817,978 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 1634,9 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 49) como sendo o íon de m/z 1634,9 na forma $[M+H]^+$; a perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1617,9. Uma série completa de íons b pode ser observada no espectro: m/z 1504,9 (b_{13}), m/z 1433,8 (b_{12}), m/z 1318,7 (b_{11}), m/z 1205,7 (b_{10}), m/z 1091,6 (b_9), m/z 963,5 (b_8), m/z 850,5 (b_7), m/z 779,4 (b_6), m/z 666,3 (b_5), m/z 551,3 (b_4), e m/z 414,2 (b_3). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a determinação da sequência do peptídeo.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1633,9 Da, levando em consideração as séries de íons b , y e z foi: **I/L N W H D I/L A I/L K/Q N I/L D A I/L** (Figura 49). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma amidada. A distinção dos resíduos I e L dentro da cadeia peptídica foi possível pela presença dos íons: m/z 385,2 (w_4), m/z 737,37 (d_6) e m/z 907,5 (d_8). Portanto, a sequência completa para o peptídeo de 1633,9 Da é a seguinte:



Estes dois últimos peptídeos (Figura 47 e 49) são bem similares a outros peptídeos de vespas da família dos mastoparanos. Segundo Park e colaboradores (1995), os mastoparanos apresentam várias atividades biológicas diferentes. Por exemplo, são potentes agentes promotores de excitação de diversas células de mamíferos (PARK et al., 1995); estimuladores da secreção de histamina de mastócitos, (NAKAJIMA, 1986); de serotonina a partir de plaquetas (HIGASHIJIMA et al., 1990); e de prolactina a partir da pituitária anterior (HIRAI et al., 1979a), mesmo em baixas concentrações ($3 \times 10^{-7}M$). Segundo Pfeiffer e colaboradores (1995), esses peptídeos podem facilitar a formação de poros em membranas; além disso, podem apresentar atividade hemolítica, como é o caso do mastoparano-X do veneno de *Vespa xanthoptera* (em concentração de $4 \times 10^{-6}M$) (HIRAI et al., 1979b).

De Souza e colaboradores (2005) isolaram dois mastoparanos do veneno da vespa social *P. paulista* (INWLKLGKMVIDAL_{-NH2}; IDWLKLGKMVMDVL_{-NH2}), sendo que ambos apresentaram uma forte atividade hemolítica, desgranuladora de mastócitos e quimiotática. O novo peptídeo descrito, que apresenta similaridade com estes peptídeos descritos anteriormente, deverá ser sintetizado e estudado futuramente a fim de avaliar sua atividade e função no veneno, assim como os outros peptídeos encontrados neste trabalho.

No tempo de retenção de 27,6-27,9 minutos (fração 9) outro peptídeo teve sua sequência determinada. A sequência deste peptídeo de massa 1051,3 Da (Figura 50) foi determinada a partir da interpretação do espectro MS² (Figura 51) do íon de m/z 526,8 na forma $[M+2H]^{+2}$.

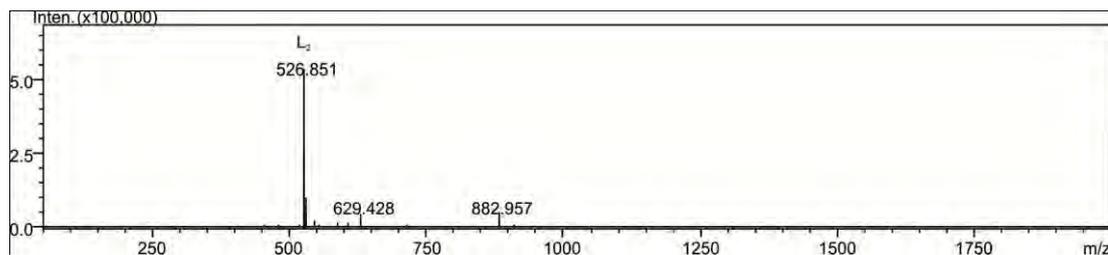


Figura 50: Espectro de MS¹ da fração.9 (27,6-27,9 minutos). O íon de m/z 526,85 (L_2) na forma $[M+2H]^{+2}$ corresponde ao íon molecular do peptídeo de massa molecular 1051,3 Da.

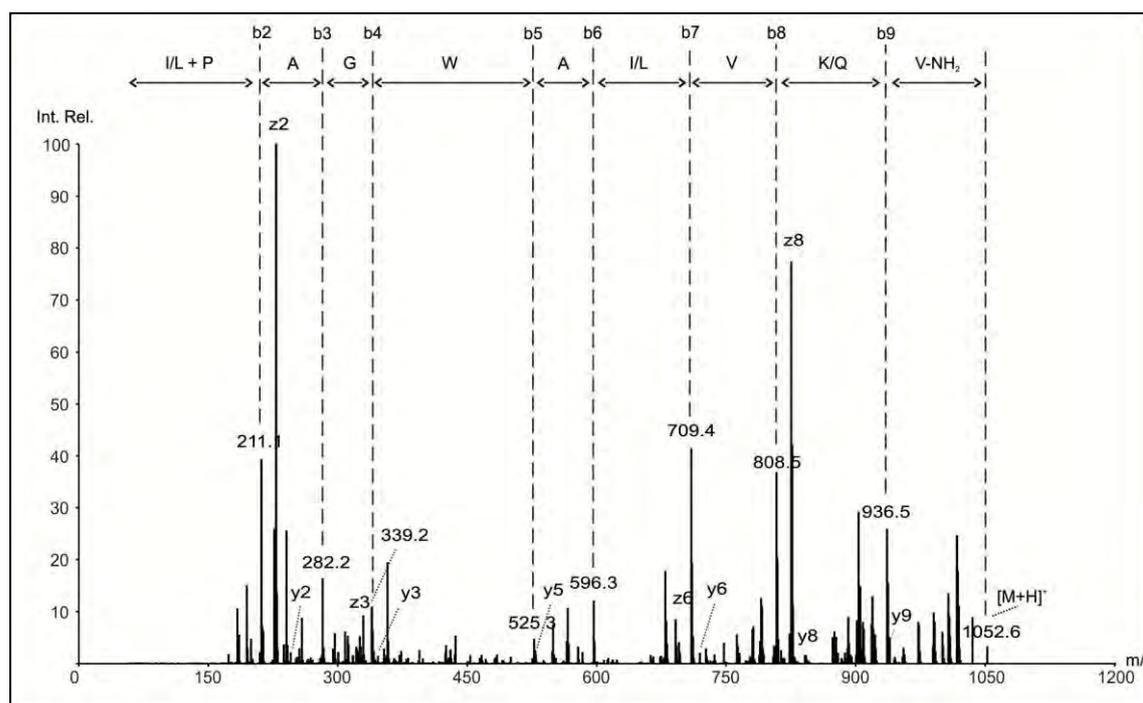


Figura 51: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1051,3 Da (fração 9). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 526,8 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 1052,6 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

O íon molecular foi identificado no espectro (Figura 51) como sendo o íon de m/z 1052,6 na forma $[M+H]^+$; a perda de amônia (17 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1035,3. Uma série completa de íons b pode ser observada no espectro: m/z 936,5 (b_9), m/z 808,5 (b_8), m/z 709,4 (b_7), m/z 596,3 (b_6), m/z 525,3 (b_5), m/z 339,2 (b_4), m/z 282,2 (b_3) e m/z 211,1 (b_2). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a determinação da sequência do peptídeo.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1051,3 Da, levando em consideração as séries de íons b e y foi: **I/L P A G W A I/L V K/Q V** (Figura 51). A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma amidada; portanto, a sequência completa para o peptídeo é a seguinte:

I/L P A G W A I/L V K/Q V_{-NH₂}.

A ambiguidade entre os resíduos de I ou L apresentado na posição 7 não pôde ser distinguido, devido a ausência de íons *d* e *w* neste sequenciamento. Serão necessários outros experimentos para que o resíduo de aminoácido desta posição possa ser resolvido. A sequência deste peptídeo é inédita, representando uma nova família a ser farmacologicamente caracterizada.

Na fração 10 (tempo de retenção de 31,9-32,4 minutos) outro peptídeo teve sua sequência determinada. O peptídeo de massa 1332,8 Da (Figura 52) foi sequenciado à partir da interpretação do espectro MS² do íon de *m/z* 526,851(M₂) na forma [M+2H]⁺² (Figura 53).

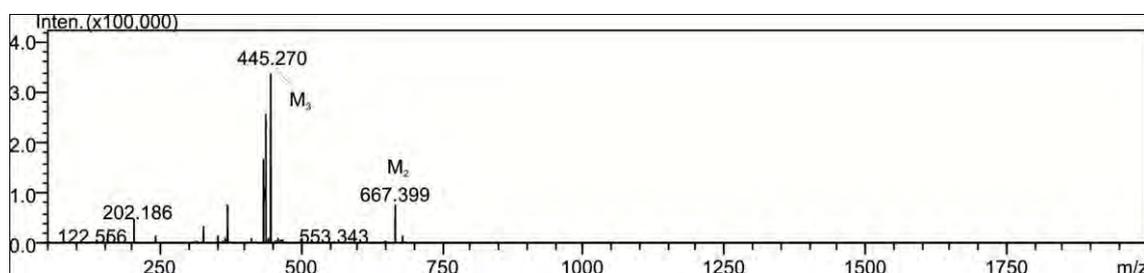


Figura 52: Espectro de MS¹ da fração.10 (31,9-32,4 minutos); os íons de *m/z* 667,39 (M₂) e 445,27 (M₃) correspondem aos íons moleculares do peptídeo nas formas [M+2H]⁺² e [M+3H]⁺² respectivamente.

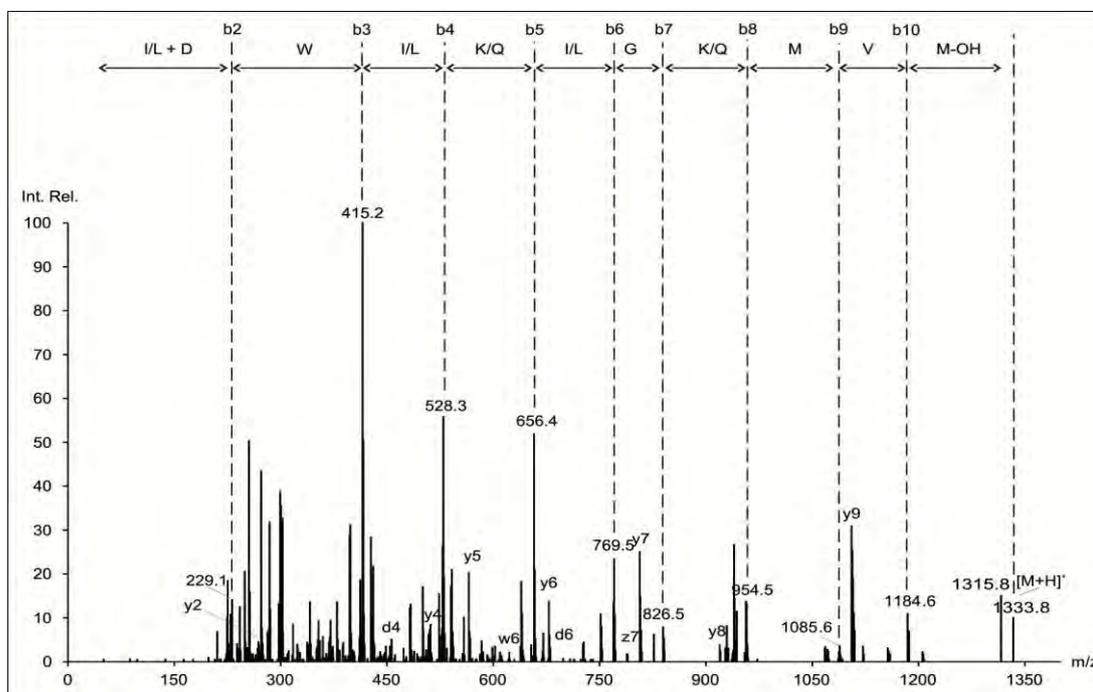


Figura 53: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1332,8 Da (fração 10). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de *m/z* 667,4 na forma [M+2H]⁺², sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íon-fragmentos do tipo *b* a partir do íon molecular de *m/z* 1333,8 na forma [M+H]⁺, bem como sua interpretação.

Na Figura 53 o íon molecular foi o de m/z 1333,8 na forma $[M+H]^+$. A perda de água (18 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 1315,8. Uma série completa de íons do tipo b pode ser observada no espectro: m/z 1184,6 (b_{10}), m/z 1085,6 (b_9), m/z 954,5 (b_8), m/z 826,5 (b_7), m/z 769,5 (b_6), m/z 656,4 (b_5), m/z 528,3 (b_4), m/z 415,2 (b_3) e m/z 229,1 (b_2). A subtração dos valores de m/z entre os valores consecutivos de íons b permitiu a determinação da sequência do peptídeo, com algumas pequenas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q.

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 1332,8 Da, levando em consideração as séries de íons b e y foi: **I/L D W I/L K/Q I/L G K/Q M V M**. A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma de ácido livre. A distinção dos resíduos I e L dentro da cadeia peptídica foi possível pela presença dos íons: m/z 458,2 (d_4) e m/z 619,3 (d_6). Portanto, a sequência completa para o peptídeo de 1332,8 Da é a seguinte:

I/L D W L K/Q L G K/Q M V M_{OH}.

Esse peptídeo parece ser do grupo dos mastoparanos (Tabela 4), e pode ser um fragmento de clivagem proteolítica de um outro peptídeo já identificado por de Souza e colaboradores (2009) no veneno de *P. paulista*, denominado “Polybia-MP-III” (IDWKLKLGKMDV_{L-NH2}), uma vez que a sequência encontrada é muito parecida à já conhecida. Este peptídeo já conhecido possui atividade desgranuladora de mastócitos, hemolítica e antibiótica (DE SOUZA et al., 2009).

Tabela 4: Mastoparanos descritos em trabalhos anteriores e os novos peptídeos com características similares isolados do veneno de *Polybia paulista* neste trabalho.

| ESPÉCIE | PEPTÍDEO | SEQUÊNCIA PRIMÁRIA | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| <i>Vespa analis</i> | Mastoparano A ¹ | I | K | W | K | A | I | L | D | A | V | K | K | V | L |
| <i>Vespa basalis</i> | Mastoparano B ² | L | K | L | K | S | I | E | S | W | A | K | K | V | L |
| <i>Vespula lewisii</i> | Mastoparano ¹ | I | N | L | K | A | L | A | A | L | A | K | K | I | L |
| <i>Vespa mandarina</i> | Mastoparano-M ¹ | I | N | L | K | A | I | A | A | L | A | K | K | L | L |
| <i>Vespa tropica</i> | Mastoparano-T ¹ | I | N | L | K | A | I | A | A | F | A | K | K | I | L |
| <i>Vespa orientalis</i> | HR-I ⁴ | I | N | L | K | A | L | A | A | L | V | K | K | V | L |
| <i>Vespa orientalis</i> | Mastoparano-II ¹ | I | N | L | K | A | L | L | A | V | A | K | K | I | L |
| <i>Vespa xanthoptera</i> | Mastoparano-X ³ | I | N | W | K | G | I | A | A | M | A | K | K | L | L |
| <i>Vespa crabro</i> | Mastoparano-C ¹ | I | N | W | K | A | L | L | A | V | A | K | K | I | L |
| <i>Protonectarina sylveirae</i> | Protonectarina-MP ¹ | I | N | W | K | A | L | L | D | A | A | K | K | V | L |
| <i>Parapolybia indica</i> | Parapolybia-MP ¹ | I | N | W | K | K | M | A | A | T | A | L | K | M | I |
| <i>Polybia paulista</i> | Polybia-MP I ⁶ | I | D | W | K | K | L | L | D | A | A | K | Q | I | L |
| <i>Polybia paulista</i> | Polybia-MP II ⁶ | I | D | W | K | L | K | G | K | M | V | I | D | A | L |
| <i>Polybia paulista</i> | Polybia-MP III ⁸ | I | D | W | L | K | L | G | K | M | V | M | D | V | L |
| <i>Anterhychium flvomarginatum micado</i> | EMP-AF ⁷ | I | N | L | L | K | I | A | K | G | I | I | K | S | L |
| <i>Protopolybia sedula</i> | P-13 ¹ | I | N | W | L | K | L | G | K | K | V | S | A | I | L |
| <i>Apoica pallens</i> | Apoica-MP ¹ | I | N | W | L | K | I | A | K | K | V | A | G | M | L |
| <i>Vespa orientalis</i> | HR-II ⁴ | F | L | P | L | I | L | G | K | L | V | K | G | L | L |
| <i>Agelaia pallipes pallipes</i> | App-5 ⁵ | I | N | W | K | A | I | L | E | R | I | K | M | A | |
| <i>Agelaia pallipes pallipes</i> | App-7 ⁵ | I | N | W | L | K | L | G | K | A | I | I | D | A | |
| PEPTÍDEOS MASTOPARANOS NOVOS | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Polybia paulista</i> | | I/L | D | W | L | K/Q/L | R | V | I | S | V | I | D | I/L | |
| <i>Polybia paulista</i> | | I/L | N | W | H | D | I | A | I | K/QN | I | D | A | I/L | |
| <i>Polybia paulista</i> | | I/L | D | W | L | K/Q/L | G | K/Q | M | V | M | | | | |

¹NAKAJIMA et al., 1986; ²HO et al., 1994; ³HIRAI et al., 1979b; ⁴ARGIOLAS; PISANO, 1984a; ⁵MENDES et al., 2004b; ⁶de SOUZA et al., 2004; ⁷KONNO et al., 2000; ⁸de SOUZA et al., 2009.

No tempo de retenção de 21,0 - 21,2 minutos foi obtido um outro peptídeo que teve sua sequência determinada. A sequência deste peptídeo de massa 845,3 Da (Figura 54) foi obtida à partir da interpretação do espectro MS² (Figura 55) do íon de m/z 526,851 na forma $[M+2H]^{+2}$.

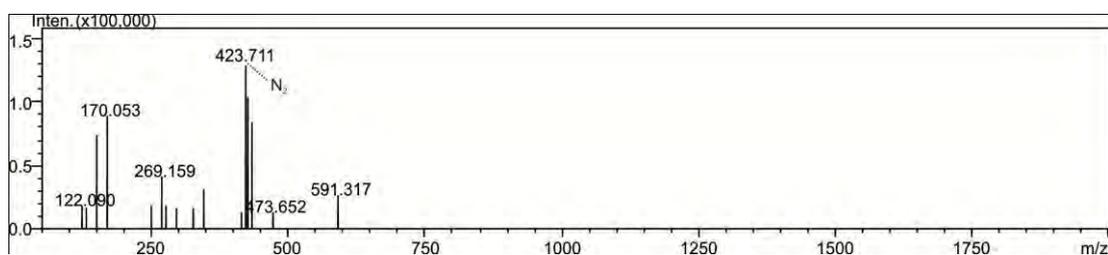


Figura 54: Espectro de MS¹ referente ao peptídeo de massa molecular 845,4 Da, eluído no tempo de retenção de 21-21,2 minutos). O íon de m/z 423,7 (N_2) corresponde ao íon molecular do peptídeo na forma $[M+2H]^{+2}$.

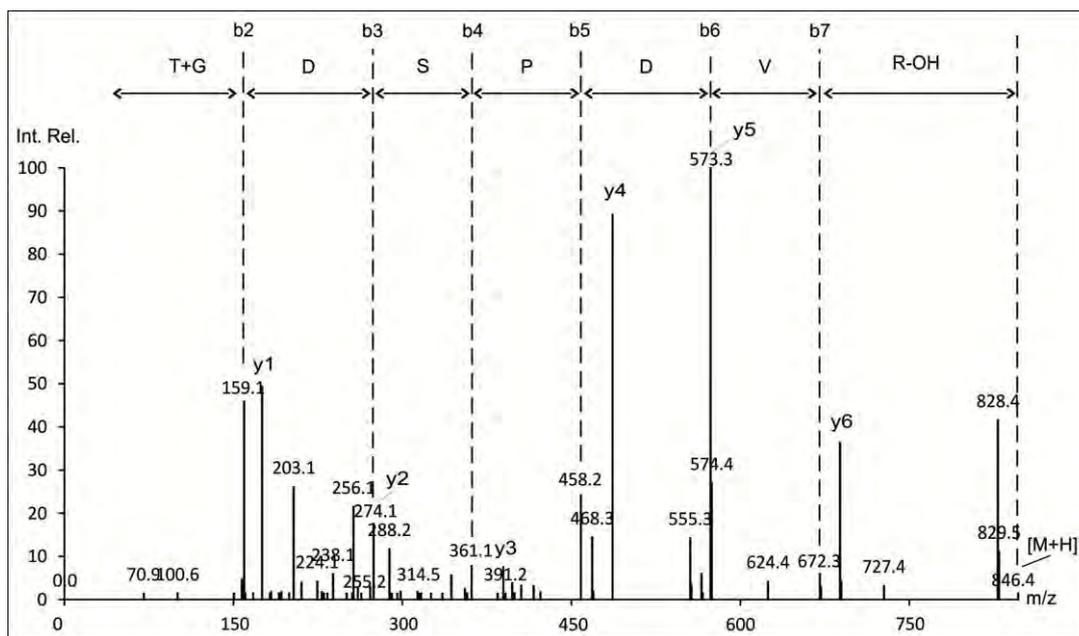


Figura 55: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 845,4 Da. Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 423,7 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo b a partir do íon molecular de m/z 846,4 na forma $[M+H]^+$, bem como sua interpretação.

Na Figura 55 o íon molecular obtido foi o de m/z 846,4 na forma $[M+H]^+$. A perda de água (18 Da) a partir do íon molecular resultou no íon de m/z 828,4. Uma série completa de íons do tipo b pode ser observada no espectro: m/z 672,3 (b_7), m/z 573,3 (b_6), m/z 458,2 (b_5), m/z 361,1 (b_4), m/z 274,1 (b_3) e m/z 159,1 (b_2).

Assim, a sequência determinada para o peptídeo 845,4 Da, levando em consideração as séries de íons b e y foi: **T G D S P D V R**. A massa molecular deste peptídeo, frente à sequência acima, é coerente com a presença da porção C-terminal na forma de ácido livre; portanto, a sequência completa para o peptídeo de 845,8 Da é a seguinte: **T G D S P D V R-OH**.

Assim, neste trabalho foi possível sequenciar 14 peptídeos do veneno de *P. paulista*, sendo 11 deles ainda não descritos na literatura (Tabela 5).

Tabela 5: Peptídeos sequenciados do veneno de *P. paulista* neste trabalho.**Peptídeos encontrados descritos em trabalhos anteriores:**I L G T I L G L L K S L_{-NH₂} / Polybia-CP (DE SOUZA et al., 2005)I N W L K L G K M V I D A L_{-NH₂} / Polybia-MPII (DE SOUZA et al., 2009)I D W K K L L D A A K Q I L_{-NH₂} / Polybia-MPI (DE SOUZA et al., 2005)**Peptídeos novos****Neurocininas**R P P G F T P F R_{-OH}R A R P P G F T P F R_{-OH}R A R P P G F T P F R D T_{-OH}**Peptídeos quimitoactícos**I/L L G T I L G K/Q I L_{-OH}I/L L G T I L G T F K/Q S L_{-NH₂}I/L I/L G T I/L I/L_{-OH}**Mastoparanos**I/L D W L K/Q L R V I S V I D I/L_{-NH₂}I N W H D I A I K N I D A L_{-NH₂}I/L D W L K/Q L G K/Q M V M_{-OH}**Função desconhecida**I/L P A G W A I/L V K/Q V_{-NH₂}T G D S P D V R_{-OH}

Dentre estes peptídeos alguns já foram descritos no veneno de *P. paulista* em trabalhos anteriores, e ajudaram no processo de padronização da técnica de sequenciamento peptídico, entre eles os peptídeos Polybia-CP, Polybia-MPI e Polybia-MPII. A massa molecular de um quarto peptídeo (2359,3 Da) descrito anteriormente por de Souza (2002) e denominado Paulistina (SIKDKICKIIQAQCGKKLPFT_{-NH₂}) foi determinada no tempo de retenção entre 34,1 e 35,6 min (fração 11), porém sua sequência não pôde ser confirmada através das análises de espectrometria de massas sequenciais no presente trabalho. Este fato ocorreu devido à baixa qualidade do espectro de fragmentação deste peptídeo, que não continha todas as informações de íons suficientes para se determinar a sequência do peptídeo. A Paulistina é um peptídeo relativamente longo, contendo cisteínas em sua sequência (inclusive com formação de ponte dissulfeto), ocorrendo em baixa concentração no veneno, o que pode ter dificultado a aquisição de bons espectros de fragmentação a fim de sequenciá-la. Sendo assim, muito possivelmente fosse necessário adequar os experimentos com aumento da quantidade de amostra e otimização de condições de análises para este peptídeo.

Dois outros peptídeos descritos no veneno de *P. paulista* por Ribeiro e colaboradores (2004) contendo acetilação do N-terminal não foram detectados nos experimentos realizados no presente trabalho: Polybine-I [Ac-SADLVKKIWDNPAL_{-NH₂} (1610 Da)] e Polybine-II

[Ac-SVDMVMKGLKIWPL_{-NH₂} (1657 Da)]. Este fato deve ter ocorrido devido às diferenças constantes de composição no veneno desta espécie, oscilando as concentrações e variabilidade de compostos presentes.

Outros peptídeos pertencentes a esse veneno foram funcionalmente estudados neste trabalho, como é o caso dos peptídeos da família das cininas (Parte III).

Efeitos causados pela isomerização dos resíduos de prolina

Durante as análises com o veneno de *P. paulista* um fato interessante foi observado nos peptídeos apresentando resíduos de prolina em suas sequências: componentes aparentemente isóbaros foram detectados em diferentes tempos de retenção, porém apresentando espectros MS² (após deconvolução) idênticos quando comparados entre si. Isso sugere em princípio que tais componentes peptídicos tenham a mesma sequência de amino ácidos.

Para não tornar essa discussão muito repetitiva, escolhemos um caso típico, representado pela família das neurocininas. Assim, os peptídeos de massas moleculares 1300,7 Da e 1073,6 Da, observados na fração 1 (tempo de retenção de 2,8 à 3,6 minutos), também foram observados na fração 6 (com tempo de retenção de 21,4 à 22,7 minutos) (Figura 56). A semelhança dos espectros MS¹ e MS² (não deconvoluido) pode ser observada nas Figuras 56 e 57, respectivamente.

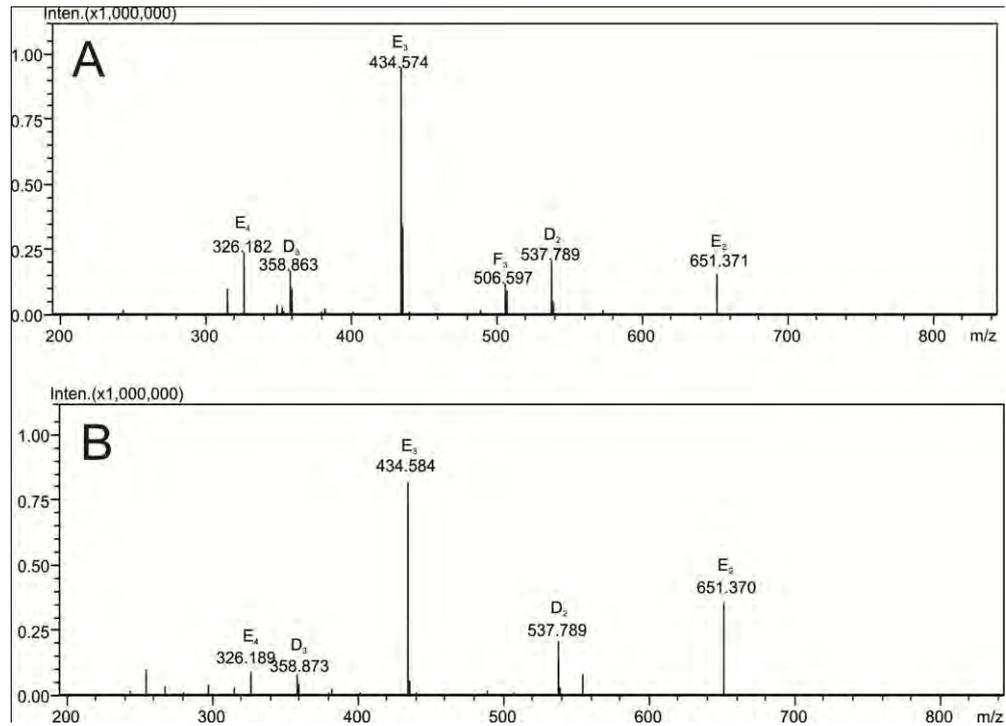


Figura 56: Espectros MS^1 das frações 1 (tempo de retenção 2 minutos) (A) e 6 (tempo de retenção 22,5 minutos) (B). Os íons de m/z 537,78 (D_2) e 358,8 (D_3) correspondem ao peptídeo de massa molecular 1073,5 Da na forma $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente; os íons de m/z 651,37 (E_2), 434,57 (E_3) e 326,18 (E_4) correspondem ao íon molecular do peptídeo de massa molecular 1300,7 Da na forma $[M+2H]^{+2}$, $[M+3H]^{+3}$ e $[M+4H]^{+4}$ respectivamente.

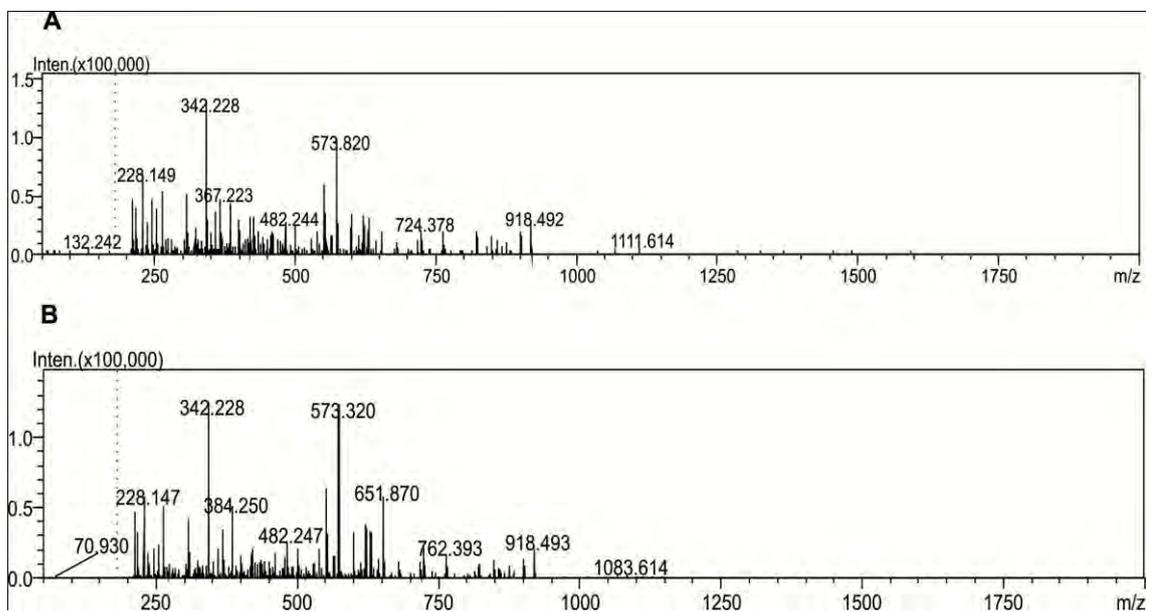


Figura 57: Espectros MS^2 não deconvolvidos do componente peptídeo de massa molecular 1300,7 Da presente nas frações 1 (tempos de retenção de 2 min) (A) e 6 (tempo de retenção de 22,5 min) (B). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 651,3 na forma $[M+2H]^{+2}$ em ambas as frações, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo.

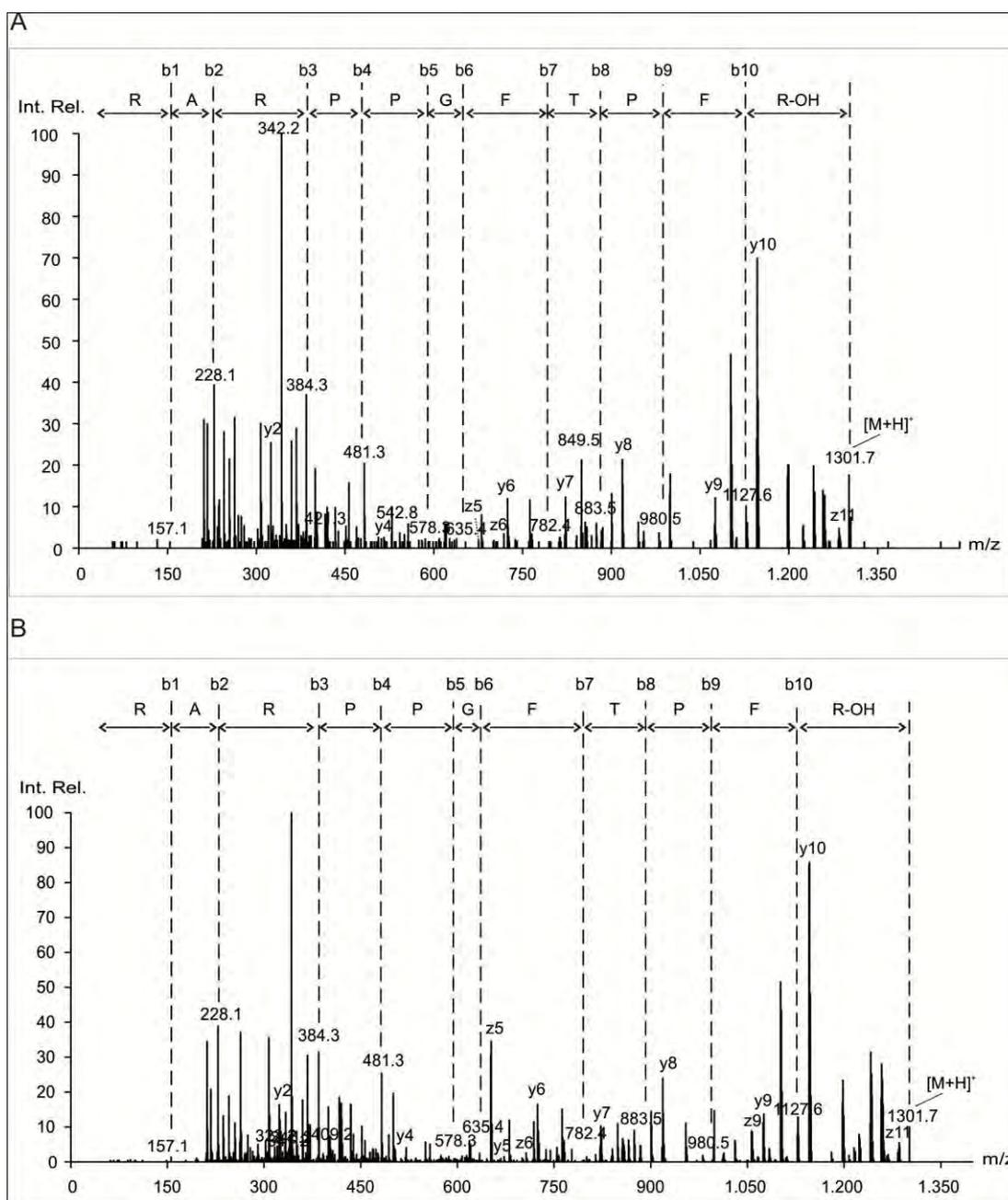


Figura 58: Espectro MS² deconvolvido do peptídeo de massa molecular 1300,7 Da nos tempos de retenção de 2 min (A) e 22,5 min (B). Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de m/z 651,3 na forma $[M+2H]^{+2}$ em ambos os casos, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. Os espectros mostram uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir do íon molecular de m/z 1301,7 na forma $[M+H]^+$, bem como as respectivas interpretações.

A análise comparativa entre os dois espectros MS² deconvolvidos para os peptídeos 1300,7 Da (Figura 58), revela que apesar de eluírem em diferentes tempos de retenção, os mesmos apresentam a mesma sequência de aminoácidos. Aparentemente, este fato deve estar relacionado à presença de resíduos de prolina na sequência do peptídeo. A prolina é um aminoácido incomum com relação a sua química, devido à sua capacidade de formação de ligação imida, que por sua vez afeta a estrutura secundária da cadeia polipeptídica, onde

muitas vezes participa da formação de loops, curvas e da hélice de poliprolina (VON HEIJNE, 1991; WILMOT; THORNTON, 1988; ADZHUBEI; STERNBERG, 1993; MACARTHUR; THORNTON, 1991; SMITH; PEASE, 1980). Enquanto a maioria das ligações peptídicas existem na geometria *trans*, aquelas que envolvem prolina (Xaa-Pro) ocorrem em *cis* ou *trans* (Figura 59). Portanto, a ocorrência de múltiplos picos para um mesmo peptídeo na distribuição da mobilidade iônica, geralmente é consequência da formação de múltiplos confôrmeros, que apresentam individualmente diferentes afinidades pelo grupo funcional cromatográfico (octadecil), em função de que cada confôrmero possui uma superfície de contato diferente com o grupo funcional cromatográfico (COUNTERMAN; CLEMMER, 2002).

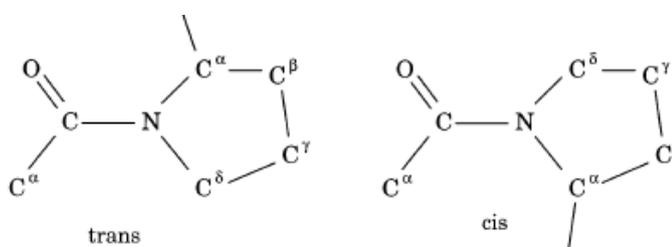


Figura 59: Esquema simplificado das conformações *cis* e *trans*, em torno de resíduos de prolina; os carbonos α foram utilizados como referências.

A isomerização da prolina, ou seja a interconversão das conformações *cis* e *trans* pela rotação em 180° através da ligação peptídica imido, acredita-se ser uma limitação no enovelamento das proteínas (BRANDTS et al., 1975).

PARTE III

4.3. Resultados das atividades biológicas.

Foram escolhidos para caracterização funcional os três peptídeos da família das neurocininas: Thr6-BK (Figura 37), RA_Thr6-BK (Figura 38) e RA_Thr6-BK_DT (Figura 39)]. Os três peptídeos foram sintetizados manualmente em fase sólida, pela estratégia Fmoc.

Os peptídeos obtidos à partir da síntese foram purificados através de cromatografia líquida (HPLC), sob fase reserva. A Figura 60 (A1, B1 e C1) mostra o cromatograma de purificação dos três peptídeos realizadas em condições isocráticas, de 20% (v/v) de ACN [contendo TFA 0,1% (v/v)]. O pico referente aos peptídeos apresentou tempo de retenção de aproximadamente 41 minutos.

Após o término da purificação de todos os peptídeos, foram feitas as análises de espectrometria de massas. Esses experimentos foram realizados tanto para a confirmação das massas corretas, quanto para verificação da pureza de cada amostra (Figura 60 A2, B2 e C2).

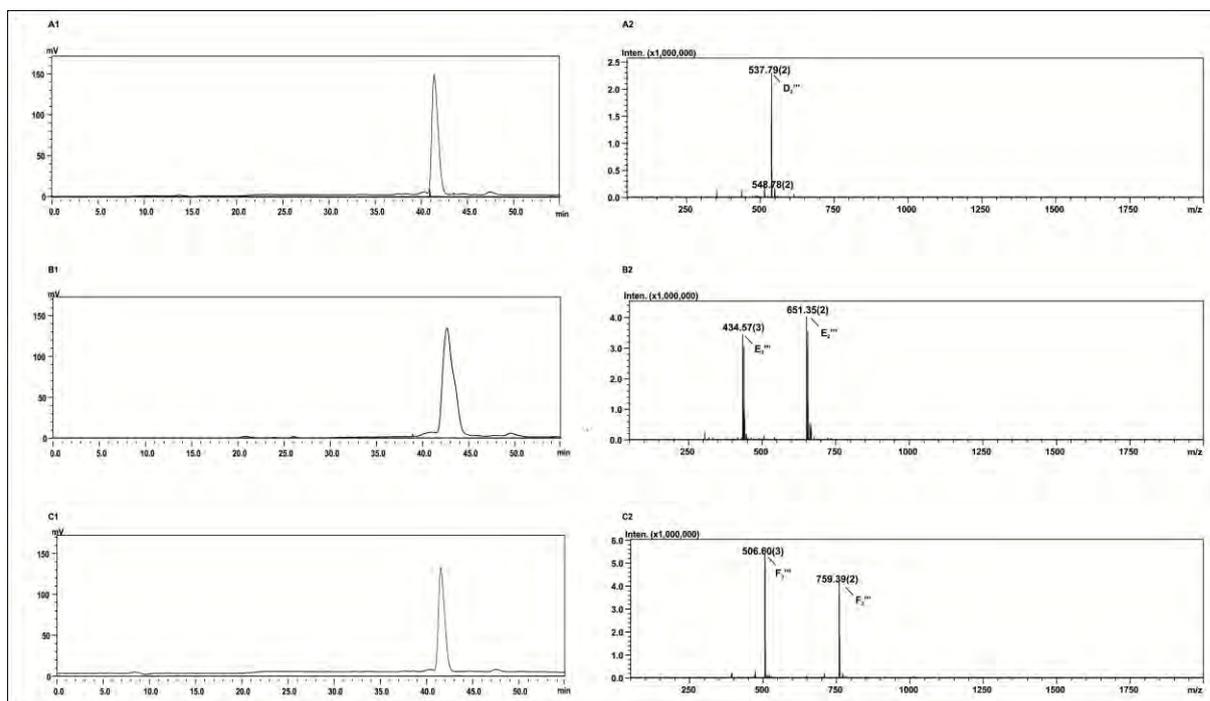


Figura 60: Cromatograma de purificação em coluna de fase reversa obtido em coluna preparativa Shimpack C-18 PREP-ODS(K) 30 x 250 mm, em uma eluição isocrática de 20% B com fluxo de 10mL/min (A1, B1 e C1) e espectro ESI-MS¹ (A2, B2 e C2) dos peptídeos sintetizados. **A1 e A2:** peptídeo Thr6-BK (1073,6 Da), indicado pelo íon de m/z 537,79 (D_2) na forma $[M+2H]^{+2}$; **B1 e B2:** peptídeo RA_Thr6-BK (1300,7 Da) indicado pelos íons de m/z 651,35 (E_2) e m/z 434,57 (E_3) nas formas $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente; **C1 e C2:** peptídeo RA_Thr6-BK_DT (1516,8 Da) indicado pelos íons de m/z 759,39 (F_2) e m/z 506,6 (F_3) nas formas $[M+2H]^{+2}$ e $[M+3H]^{+3}$, respectivamente.

A Figura 60 A2 mostra o espectro de massas referente ao peptídeo Thr6-BK (1073,6 Da). Pode ser observado o íon com valor de m/z 537,8 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1073,6 Da. A Figura 60 B2 mostra o espectro de massas referente ao peptídeo RA_Thr6-BK (1300,7 Da). Podem ser observados os íons com valores de m/z 651,35 ($[M+2H]^{2+}$) e m/z 434,57 ($[M+3H]^{3+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1300,7 Da. A Figura 60 C2 mostra o espectro de massas referente ao peptídeo RA_Thr6-BK (1300,7 Da). Podem ser observados os íons com valores de m/z 759,39 ($[M+2H]^{2+}$) e m/z 506,6 ($[M+3H]^{3+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1516,8 Da.

Assim, pode-se observar que os peptídeos sintetizados possuem massas moleculares compatíveis com as massas teóricas. Além disso, os espectros de fragmentação dos peptídeos sintéticos foram analisados e comparados aos dos peptídeos naturais, confirmando desta forma que foram corretamente sintetizados (dados não mostrados).

As atividades investigadas foram hemólise, desgranulação de mastócitos, LDH, antibiose, nociceptiva e edematogênica.

4.3.1. Hemólise

Para este ensaio, foi utilizado como padrão de hemólise o peptídeo Melitina (KATSU et al., 1988). Um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana é a Melitina, sendo este um dos componentes mais abundantes do veneno da abelha *Apis mellifera*. Este peptídeo foi descrito como sendo hemolítico, constituído por 26 resíduos de aminoácidos e com estrutura anfipática (PÉREZ-PAYÁ et al., 1997). Além disso, foi observado que o mesmo é capaz de assumir várias conformações e estados de agregação diferentes, em soluções aquosas de diferentes composições (PÉREZ-PAYÁ et al., 1995).

Os resultados dos ensaios de hemólise foram expressos em porcentagem, sendo estes valores obtidos através da comparação com um controle de 100% feito pela incubação dos eritrócitos em solução de Triton X-100 (1%, v/v). A Figura 61 mostra as curvas de atividade hemolítica em função da concentração para os três peptídeos sintéticos e para o padrão de hemólise utilizado.

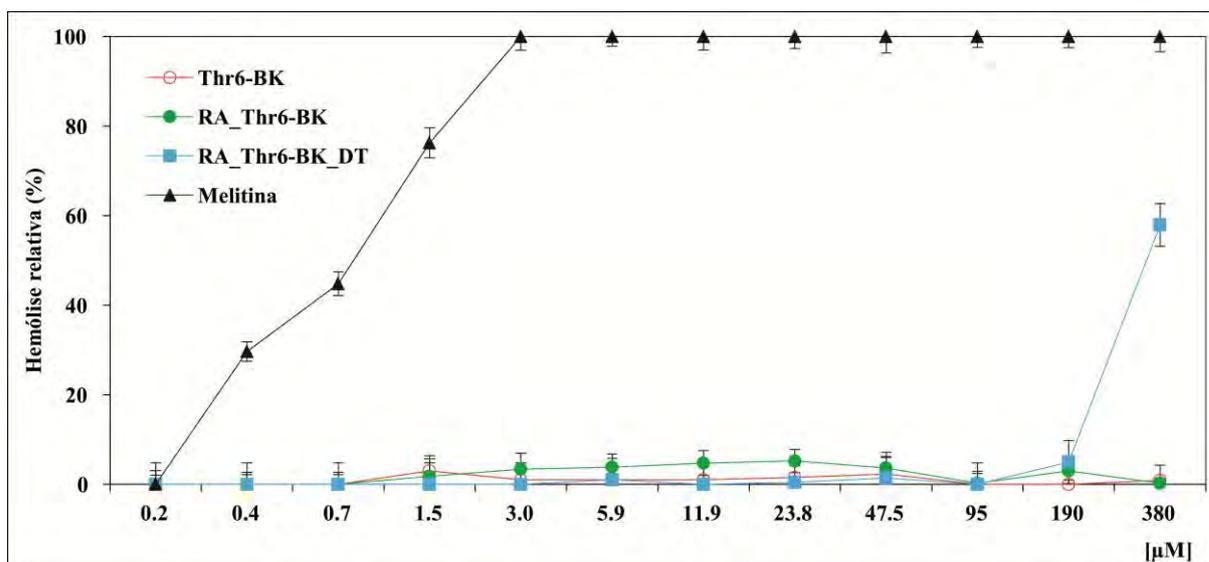


Figura 61: Atividade hemolítica dos peptídeos: Thr6-BK. (vermelho), RA_Thr6-BK (verde), RA_Thr6-BK_DT (azul), e Melitina (preto) em doze concentrações diferentes, variando de 0,2 a 380 μM. O teste foi realizado utilizando-se eritrócitos de ratos *Wistar*.

Sabe-se que a atividade hemolítica é dependente de perturbações na membrana dos eritrócitos causada pelos peptídeos. Porém, neste caso, os resultados demonstram que estas perturbações não ocorrem em presença das neurocininas como as encontradas no presente trabalho. Pode-se constatar que a melitina, um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana, utilizado como padrão, apresentou 100% de atividade

hemolítica na concentração de 3 μM , enquanto que todos os peptídeos testados não apresentaram nenhuma atividade hemolítica significativa em doses mais baixas. Somente o peptídeo RA_Thr6_DT apresentou 60% de atividade na dose mais elevadas (380 $\mu\text{g/mL}$).

4.3.2. Desgranulação de mastócitos

O ensaio de desgranulação de mastócitos foi realizado utilizando-se mastócitos peritoneais de ratos *Wistar*. As amostras foram ensaiadas em diferentes concentrações, variando de 5,9 μM a 380 μM . Os resultados foram expressos em porcentagem de desgranulação. O padrão utilizado para este ensaio foi o peptídeo HR1 (INLKAI AALVKKVL_{-NH2}) que é um mastoparano isolado do veneno da vespa *Vespa orientalis*, causador de desgranulação de mastócitos e, conseqüentemente, inicia a liberação de histamina (TUICHIBAEV et al., 1988).

A Figura 62 representa a atividade de desgranulação de mastócitos peritoneais em função das concentrações de cada um dos peptídeos; tal atividade foi expressa em porcentagem, sendo valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v).

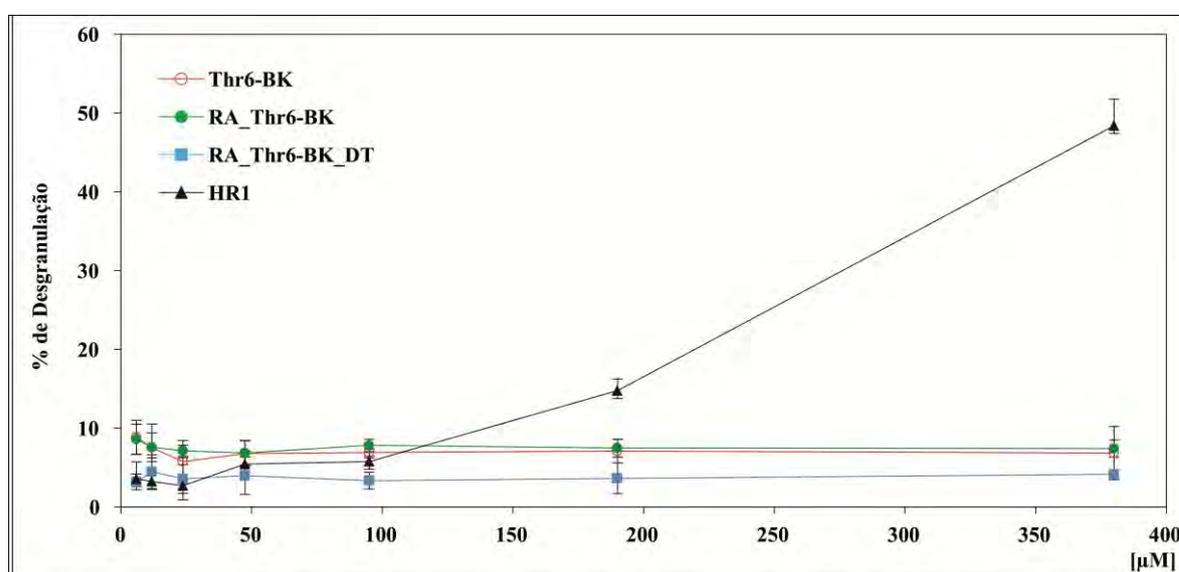


Figura 62: Atividade desgranuladora de mastócitos peritoneais de ratos *Wistar* dos peptídeos Thr6-BK (vermelho), RA_Thr6-BK (verde), RA_Thr6-BK_DT (azul), e HR1 (preto) em seis concentrações diferentes.

Os mastócitos são células preenchidas com vários grânulos que contêm histamina e outros potentes agentes biologicamente ativos; quando expostos a substâncias estranhas, liberam os grânulos citoplasmáticos ocasionando a desgranulação (HIGASHIJIMA et al.,

1990; MENDES et al., 2005). Os resultados demonstram que em presença das três neurocininas do veneno de *P. paulista*, não ocorre a desgranulação dos mastócitos. Já na presença do peptídeo padrão, HRI, podemos constatar a ocorrência de 50% de desgranulação na concentração de 380 μM .

4.3.3. Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos, coletados da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*, assim como descrito para os ensaios de desgranulação (item 4.3.2.). Os resultados de LDH estão demonstrados na figura 63 e foram expressos em porcentagem, valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v). O peptídeo HR1 também foi utilizado como padrão neste ensaio.

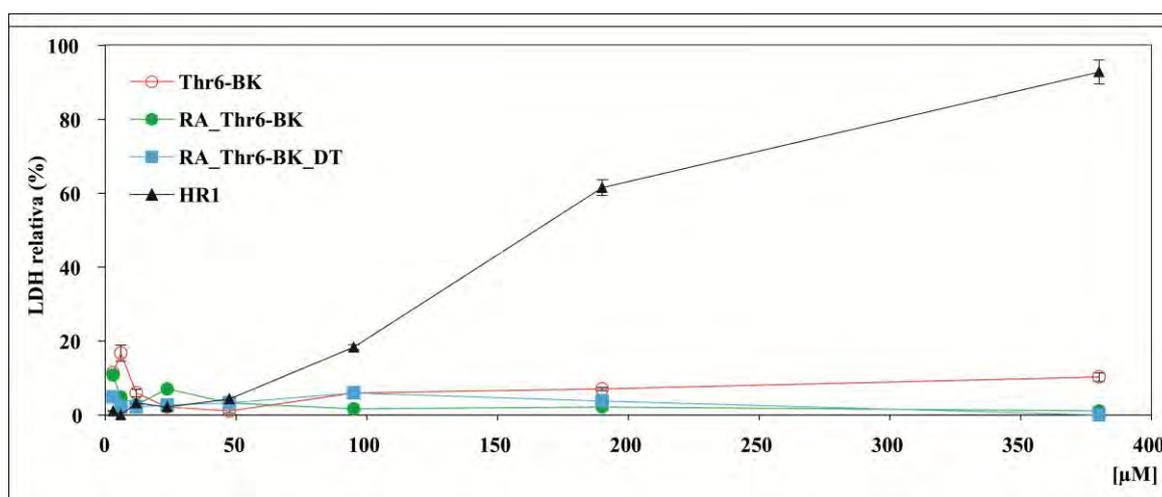


Figura 63: Atividade de LDH dos peptídeos Thr6-BK (vermelho), RA_Thr6-BK (verde), RA_Thr6-BK_DT (azul), e HR1 (preto) em oito concentrações diferentes.

A enzima lactato desidrogenase é de localização citoplasmática, e sua liberação para o meio extracelular é utilizada como indicador de lise dos mastócitos. Os resultados demonstram que em presença das três neurocininas não ocorre essa liberação da lactato desidrogenase do citoplasma dos mastócitos. Na presença do peptídeo padrão HR1 na concentração de 190 μM , pode-se constatar a ocorrência de liberação de 60% da atividade de LDH.

4.3.4. Antibiose

A tabela 6 mostra os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibiótica realizado para os três peptídeos sintéticos, em comparação a outros peptídeos de venenos de vespas, descritos em literatura, e com um antibiótico padrão (tetraciclina), sendo os resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6: Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para os três peptídeos estudados no presente trabalho, peptídeos de referencia e para o padrão do experimento (Tetraciclina), frente à bactérias Gram+ e Gram-.

| PEPTÍDEOS | Valores de MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------|--------------------|
| | Gram - | | Gram + | |
| | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> |
| Thr6-BK | >500 | >500 | >500 | >500 |
| RA_Thr6-BK | >500 | >500 | >500 | >500 |
| RA_Thr6-BK_DT | >500 | >500 | >500 | >500 |
| Tetraciclina | 15,60 | 93,75 | 2,43 | 15,60 |
| PEPTÍDEOS DE REFERENCIA | | | | |
| Polybia-MPI ⁵ | 5,80 | 46,80 | 7,81 | 4,88 |
| Parapolybia-MP ⁵ | 3,90 | 15,60 | 2,92 | 7,81 |
| Anoplin ¹ | 50,00 | 20,00 | 5,00 | 20,00 |
| Crabrolina ² | 150,00 | - | - | 75,00 |
| EMP-AF ³ | 50,00 | 20,00 | 5,00 | - |
| Mastoparano-M ⁴ | 12,50 | 12,50 | 6,25 | - |

¹Konno et al. (2001); ²Krishnakumari; Nagaraj (1997); ³Konno et al. (2000); ⁴Li et al. (2000); ⁵De Souza (2006).

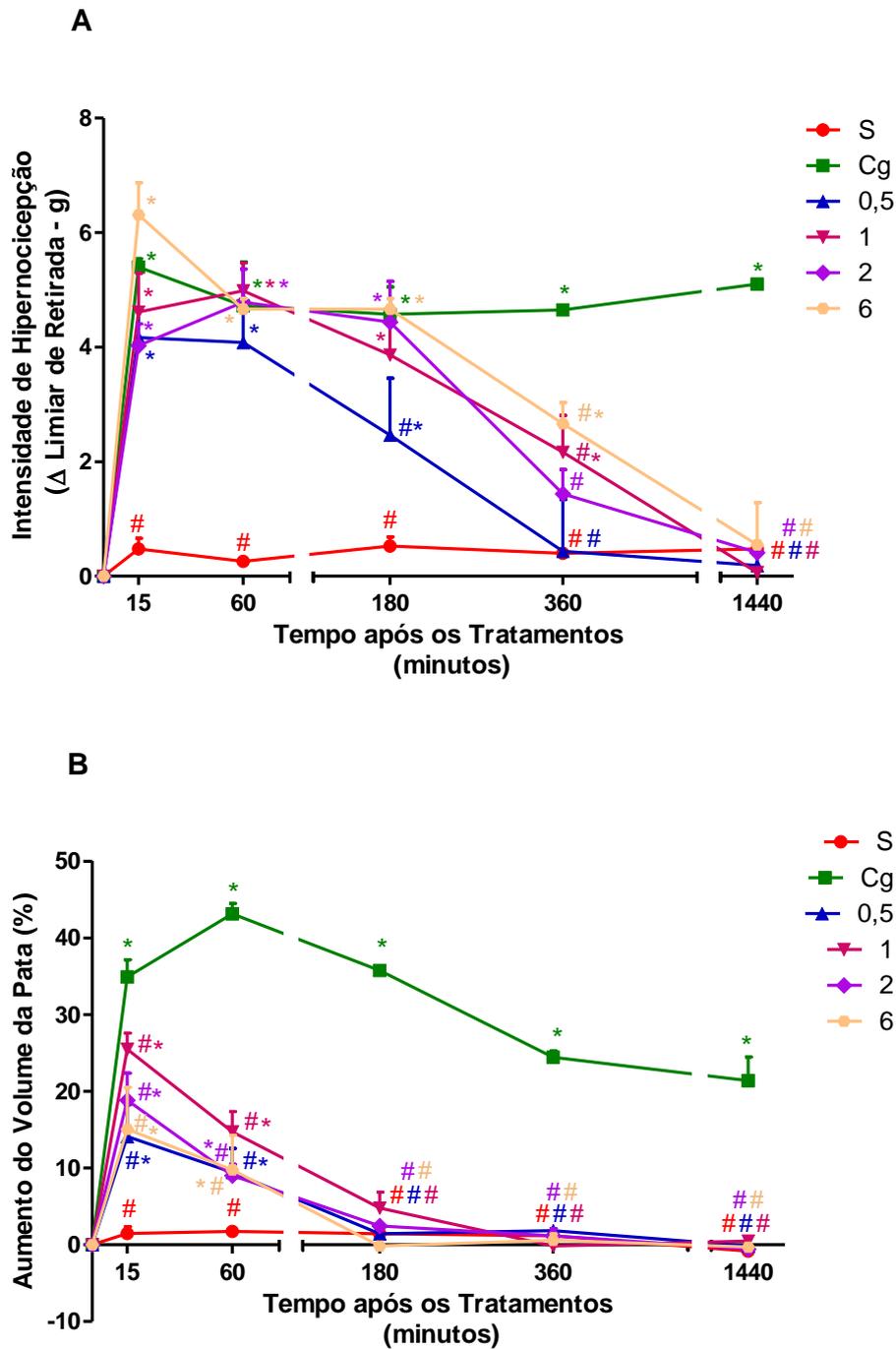
Como pode ser observado na tabela 6 os peptídeos da família das neurocininas isolados neste trabalho (Thr6-BK, RA_Thr6-BK, RA_Thr6-BK_DT), não inibiram o crescimento bacteriano (Gram + e -) nas concentrações utilizadas, assim, não apresentam atividade antibiótica considerável.

4.3.5. Atividades Farmacológicas de Dor e Inflamação

4.3.5.1. Efeito da cinina Thr6-BK sobre a sensibilidade dolorosa e sobre o efeito edematogênico

Foi administrado nos camundongos, por via intraplantar (i.pl.), o peptídeo Thr6-BK (0,5; 1; 2 e 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), sendo avaliados no teste de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico). Os animais controles foram administrados com o mesmo volume de salina (S) nas mesmas condições experimentais. A carragenina (Cg, i.pl., 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que houve significativo aumento na intensidade de hipernocicepção, comparável à carragenina (controle positivo) nas doses de 0,5; 1; 2 e 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ na primeira hora da administração da Thr6-BK (Figura 64A). Este aumento caracteriza o fenômeno de hipernocicepção (hiperalgesia). Cabe ressaltar que a dose de 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ da Thr6-BK apresentou maior hipernocicepção que a carragenina (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) nos primeiros 15 minutos do período experimental, demonstrando sua grande potência. Doses menores de 1 e 2 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ apresentaram seu pico de ação também após a primeira hora de experimentação. Nas doses de 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ (pico de ação 15 minutos após a administração de Thr6-BK) e 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ (pico de ação 60 minutos após a administração de Thr6_BK) o efeito hipernociceptivo é observado até 360 minutos após o tratamento. Por outro lado, não foi observado nocicepção após 1440 minutos do período experimental para todas as doses testadas. Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (S, controle, Figura 64A).

O efeito edematogênico foi avaliado utilizando paquímetro digital. No que concerne a este efeito da Thr6-BK (0,5; 1; 2 e 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), os resultados mostraram que o efeito edematogênico é apresentado até 60 minutos do tratamento. A carragenina acarretou aumento significativo do volume da pata dos animais (edema), quando comparado aos camundongos tratados, com salina (S, controle, Figura 64B) durante todo o período de observação. O efeito edematogênico da Thr6-BK foi maior na dose de 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ observado até a 60 minutos após o período de experimentação. Por outro lado, a solução salina nestas mesmas condições experimentais, não interferiu com o volume da pata dos animais durante todo o período de observação (Figura 64B).



4.3.5.2. Efeito da cinina RA_Thr6-BK sobre a sensibilidade dolorosa e sobre o efeito edematogênico

Foi administrado nos camundongos, por via intraplantar (i.pl.), o peptídeo RA_Thr⁶-BK (0,5; 1; 2 e 6 µg/50 µL), sendo avaliados no teste de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico). Os animais controles foram administrados com o mesmo volume de salina (S) nas mesmas condições experimentais. A carragenina (Cg, i.pl., 300 µg/50 µL) foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que houve significativo aumento na intensidade de hipernocicepção nas doses de 0,5; 1; 2 e 6 µg/50 µL a partir de 15 minutos após a administração da RA_Thr6-BK (Figura 65A). Este aumento caracteriza o fenômeno de hipernocicepção (hiperalgesia). Cabe ressaltar que as doses de 0,5 e 6 µg/50 µL da RA_Thr⁶-BK apresentaram maior hipernocicepção que a carragenina (controle positivo, 300 µg/50 µL) nos primeiros 15 do período experimental demonstrando sua grande potência. O efeito hipernociceptivo da dose de 6 µg/50 µL persiste, igualmente ao observado para a carragenina, 1440 minutos após a administração desta cinina. As doses de 1 e 2 µg/50 µL apresentaram efeito hipernociceptivo até 60 e 360 minutos, respectivamente, do período experimental. A menor dose utilizada 0,5 µg/50 µL apresentou efeito hipernociceptivo de longa duração, ou seja, por até 360 minutos do período experimental. Por outro lado, não foi observado nocicepção após 1440 minutos do período experimental para as doses de 0,5, 1 e 2 µg/50 µL. Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (S, controle, Figura 65A).

O efeito edematogênico foi avaliado utilizando paquímetro digital. No que concerne a este efeito da RA_Thr6-BK (0,5 e 6 µg/50 µL), os resultados mostraram que o efeito edematogênico foi mais proeminente e apresentado nos primeiros 15 minutos do tratamento até 60 e 180 minutos, respectivamente, do período experimental. As doses de 1 e 2 µg/50 µL apresentaram efeito edematogênico de menor proporção que persistiu até 60 e 180 minutos, respectivamente, do período experimental. A carragenina acarretou aumento significativo do volume da pata dos animais (edema), quando comparado aos camundongos tratados, com salina (S, controle, Figura 65B) durante todo o período de observação. 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 65B).

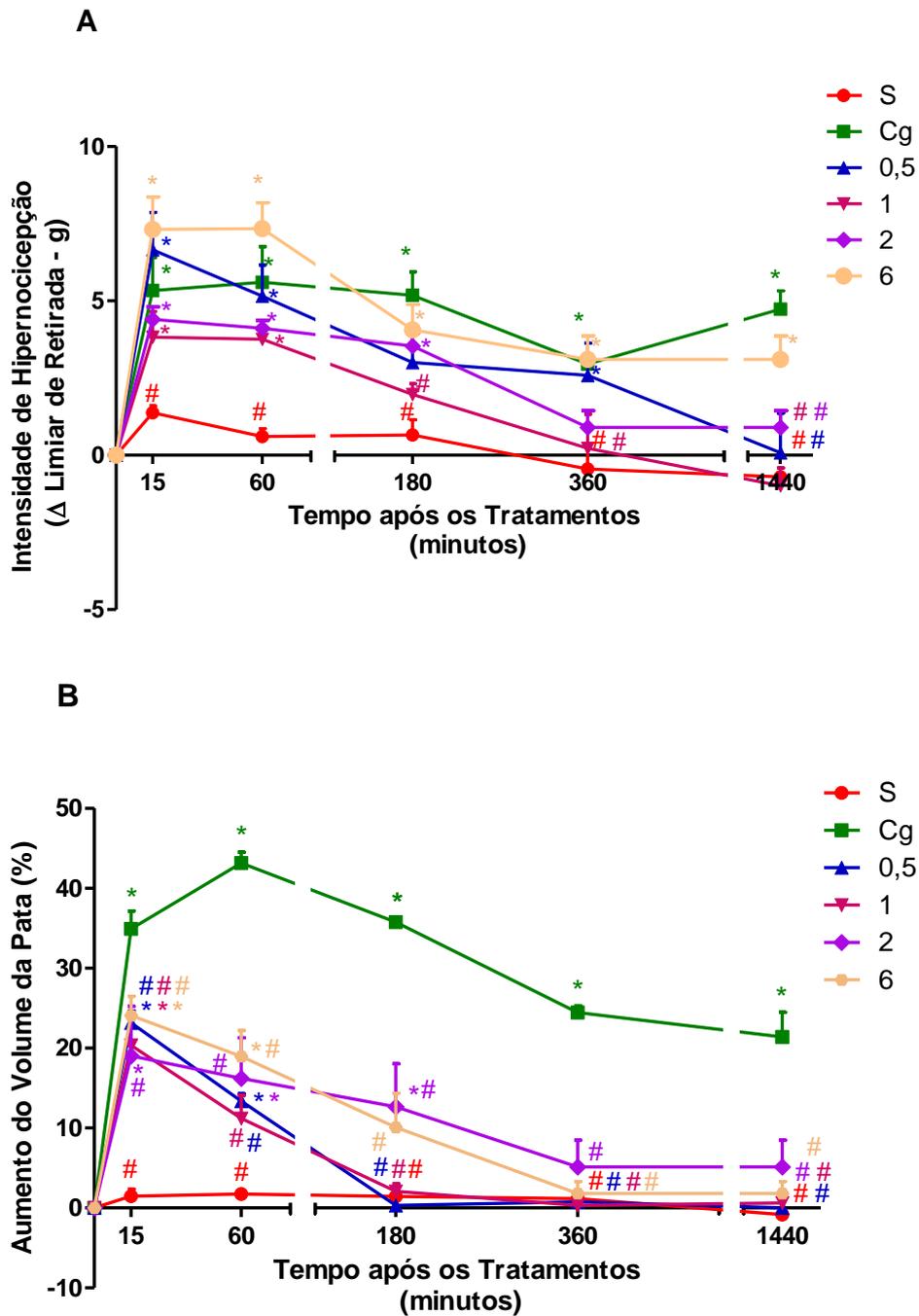


Figura 65: Efeito da cinina RA_Thr6-BK sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento do volume da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (B). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 15, 60, 180, 360 e 1440 minutos após a administração da RA_Thr⁶-BK (0,5; 1; 2 e 6 μ g/50 μ L, i.pl.) ou carragenina (Cg, 300 μ g/50 μ 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).

4.3.5.3. Efeito da cinina RA_Thr6-BK_DT sobre a sensibilidade dolorosa e sobre o efeito edematogênico

Foi administrado nos camundongos, por via intraplantar (i.pl.), o peptídeo RA_Thr6-BK_DT (0,5; 1; 2 e 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), sendo avaliados no teste de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico). Os animais controles foram administrados com o mesmo volume de salina (S) nas mesmas condições experimentais. A carragenina (Cg, i.pl., 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que houve significativo aumento na intensidade de hipernocicepção nas doses de 0,5; 1; 2 e 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ a partir de 15 minutos após a administração da RA_Thr6-BK_DT (Figura 66A). Este aumento caracteriza o fenômeno de hipernocicepção (hiperalgesia). Cabe ressaltar que a dose de 0,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ da RA_Thr6-BK_DT apresentou hipernocicepção comparável à carragenina (controle positivo, 300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) até 60 minutos do período experimental. Já as doses maiores de 1, 2 e 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ apresentaram este efeito até 180 minutos após a administração desta cinina. Por outro lado, não foi observado nocicepção 360 minutos do período experimental para todas as doses testadas. Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (S, controle, Figura 66A).

O efeito edematogênico foi avaliado utilizando paquímetro digital. No que concerne a este efeito da RA_Thr6-BK_DT, os resultados mostraram que a dose de 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ apresentou efeito edematogênico mais proeminente, comparável à carragenina, apresentado nos primeiros 15 minutos do tratamento persistindo por até 60 minutos do período experimental. As doses de 0,5; 1 e 2 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ apresentaram efeito edematogênico de menor proporção que persistiu também por até 60 minutos do período experimental. A carragenina acarretou aumento significativo do volume da pata dos animais (edema), quando comparado aos camundongos tratados, com salina (S, controle, Figura 66B) durante todo o período de observação. 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 66B).

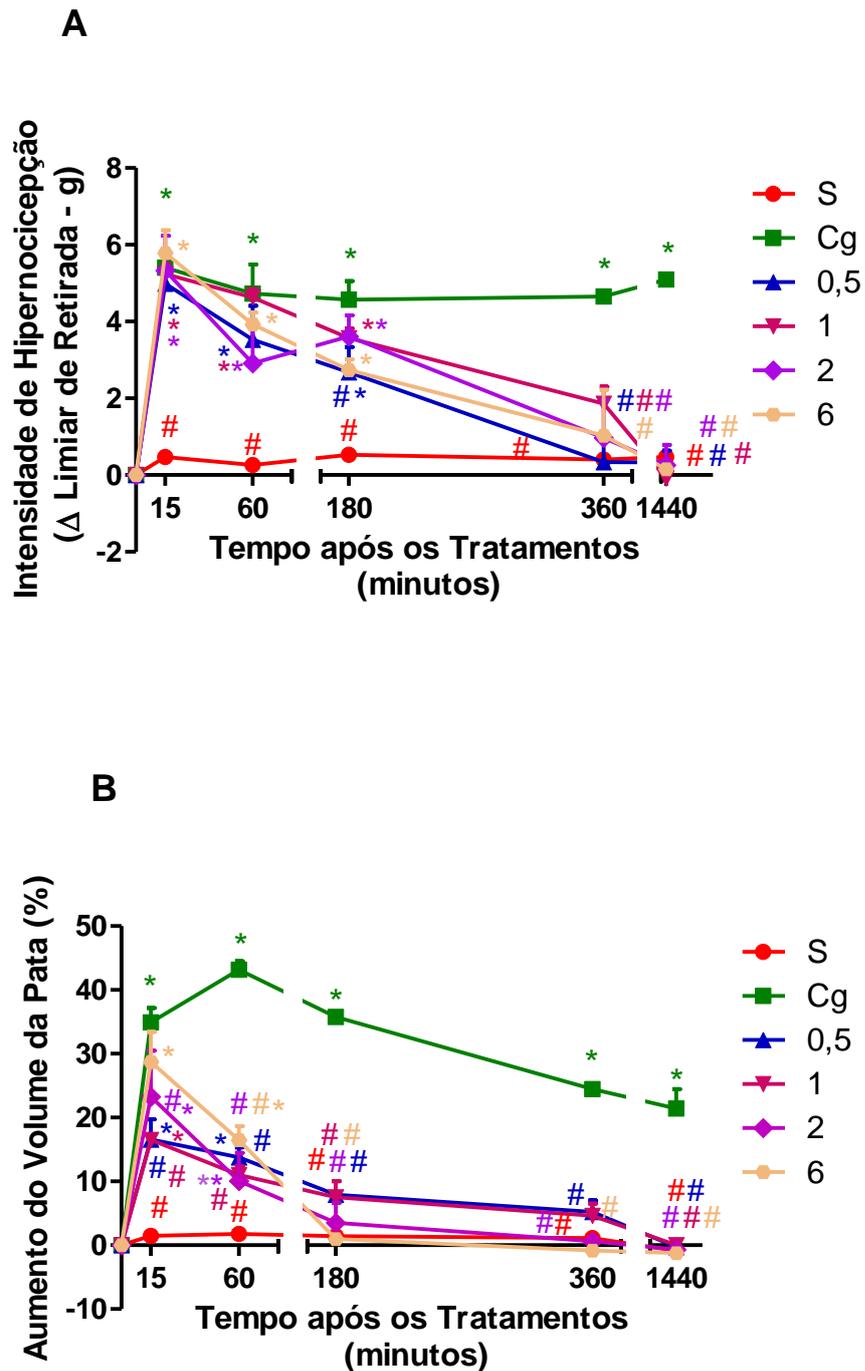


Figura 66: Efeito da cinina RA_Thr⁶-BK_DT sobre a sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico e sobre o aumento do volume da pata (edema). O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (**A**). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (**B**). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 15, 60, 180, 360 e 1440 minutos após a administração da RA_Thr⁶-BK_DT (0,5; 1; 2 e 6 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, 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).

A dor é considerada um problema de saúde pública, uma vez que interfere na qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, dados da Organização Mundial de Saúde relatam que cerca de 40% dos pacientes que sofrem de dor não dispõem de tratamento adequado (HANKS et al., 2001; JACOX et al., 1994). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), esta é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial e/ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tais lesões. A dor, portanto, é um processo cognitivo e dependente da memória, aspectos culturais e psíquicos.

Os nociceptores (receptores para a dor) são terminações nervosas livres desprovidas de estruturas receptoras específicas sendo, portanto, uma continuação da própria fibra nervosa. Os neurônios aferentes primários detectam o estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução), conduzem o impulso da periferia para a medula espinhal e transferem esses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal (transmissão sináptica) (CAVIEDES; HERRANZ, 2002). Da medula espinhal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

As toxinas animais sempre foram alvo dos pesquisadores, ora como ferramentas de investigação científica, ora como substâncias com aplicação terapêutica. Neste sentido, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o possível efeito analgésico/hipernociceptivo, anti-inflamatório/inflamatório da bradicinina (Thr6-BK) e das neurocininas RA_ Thr6-BK e RA_ Thr⁶-BK_DT encontradas no veneno da vespa *Polybia paulista*.

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). A dor pode continuar por várias horas e a ardência por alguns dias. Também se observa 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 ferroada (HABERMANN, 1972; EDERY et al., 1978; OLIVEIRA, 2000; LORENZI, 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). O presente trabalho mostrou efeito edematogênico de curta duração causado pelas cininas. Este resultado pode estar

relacionado ao fato dos ensaios para hemólise, desgranulação de mastócitos e quimiotaxia terem sido negativos, demonstrando baixa toxicidade celular e potencial edematogênico das cininas Thr6-BK, RA_Thr6-BK e RA_Thr6-BK_DT. Não somente a histamina, mas outros mediadores químicos podem ser liberados, contribuindo com a nocicepção e edema observada para as cininas.

Dados semelhantes foram observados pelo nosso grupo através do estudo sistemático da secapina, um polipeptídeo isolado do veneno de abelha *Apis mellifera*. A secapina não induziu atividade hemolítica, desgranuladora de mastócitos e quimiotática. Porém, a secapina induziu efeito hiperalgésico e edematogênico mediado, particularmente por leucotrienos, uma vez que antagonistas de receptores de leucotrieno foram capazes de reverter a hipernocicepção e edema induzidos por este peptídeo. Estes resultados sugeriram que a secapina contribui com a inflamação e dor induzido pelo veneno de abelha *Apis mellifera* (MOURELLE, 2011).

No que concerne o efeito inflamatório de cininas presentes em venenos de vespas, De Paula e colaboradores (2005) analisaram o recrutamento leucocitário e a formação de edema na cavidade peritoneal de ratos injetados com o veneno da vespa *Polybia paulista*, e mostraram que a formação de edema foi significativamente inibida pela administração de pirilamina, sugerindo que receptores de histamina do tipo H1 medeiam a formação de edema induzido pelo veneno da vespa *Polybia paulista*. Yshii e colaboradores (2009) também evidenciaram a participação de receptores histaminérgicos do tipo H1 na formação edematogênica induzida pelo veneno da vespa *Polistes lanio lanio*. A histamina exógena ou liberada pelos mastócitos induz edema em humanos e em muitas espécies de animais, incluindo os roedores, este processo ocorre via estimulação de receptores histaminérgicos H1 (TEIXEIRA et al., 2006). Além do aumento da permeabilidade microvascular, a liberação de histamina pelos mastócitos pode resultar em eritema, vasodilatação, hipeternia, prurido e uma reação de hipersensibilidade característica de indivíduos sensíveis ao veneno de himenópteros (FITZGERALD; FLOOD, 2006). Eno (1997) mostraram o desenvolvimento de edema de maneira dose-dependente induzida pelo veneno de vespa *Polistes fuscatus*. Antagonistas histaminérgicos H1 e H2 (meclizina e cimetidina, respectivamente), inibiram o desenvolvimento do fenômeno edematogênico.

Nossos resultados mostraram que todas as cininas estudadas apresentaram potente efeito hipernociceptivo e edematogênico. Cabe ressaltar que as pequenas doses de 1 µg/50 µL da Thr6-BK e RA_Thr6-BK_DT, bem como a de 0,5 µg/50 µL da RA_Thr6-BK, apresentaram grande potencial hipernociceptivo e edematogênico, uma vez que foram as

menores doses utilizadas de cininas equivalentes a nocicepção apresentada pela carragenina (controle positivo). Cabe ressaltar que a dose de carragenina utilizada é 300 vezes maior do que as utilizadas para as cininas (300 µg/50 µL de carragenina versus 0,5 e 1 µg/50 µL de cininas). Estes dados, analisados em conjunto, demonstram que as cininas presentes no veneno bruto da vespa *P. paulista* são substâncias importantes para a dor e edema induzido por este veneno. Os mecanismos envolvidos nestes efeitos acima mencionados poderão ser alvos de estudos futuros.

São poucos os relatos científicos abordando cininas e dor. Neste sentido, o trabalho mais recente foi desenvolvido por Pico e colaboradores (2010), que utilizaram quatro neurocininas isoladas do veneno da vespa solitária *Cyphononyx fulvognathus*. O modelo experimental para avaliação da sensibilidade dolorosa foi o de pressão de pata de ratos. Neste modelo, uma força em gramas é aplicada sob o dorso de uma das patas posteriores do animal e interrompida quando o mesmo apresenta a reação de retirada da pata. Todas as cininas testadas neste trabalho apresentaram efeito hipernociceptivo, cuja ação é em diferentes subtipos de receptores para bradicinina. As cininas Cd-146 e a fulvonina apresentaram seu efeito hiperalgésico bloqueado pelo antagonista de receptor BK1, denominado Lys-(des-Arg9, Leu8)-BK, enquanto que a cifocinina e a Thr 6-BK tiveram seu efeito revertido pelo antagonista de receptor BK2, denominado HOE-140. Estes dados indicam as diferenças farmacológicas e biológicas das cininas ora testadas.

Contrariamente ao demonstrado até o momento, Mortari e colaboradores (2007) também estudaram a ação de uma cinina isolada da vespa neotropical *Polybia occidentalis*. Neste trabalho, os autores mostraram que a administração, por via intracerebroventricular, da cinina denominada de Thr6-BK, apresenta efeito antinociceptivo (analgésico), avaliado em dois testes de sensibilidade dolorosa, o modelo da placa quente e retirada da cauda (*tail-flick*). Este efeito foi duas vezes mais potente que a morfina, droga analgésica usualmente utilizada na clínica médica.

A diversidade dos modelos de sensibilidade dolorosa utilizada, as diferentes espécies de animais empregados nos testes, as cininas isoladas de diversas vespas, as doses utilizadas e as vias de administração podem explicar, pelo menos em parte, as diferenças observadas.

Em conclusão, até o presente momento mostramos que as cininas bradicinina Thr6-BK, RA_Thr6-BK e RA_Thr6-BK_DT induziram resposta hiperalgésica e edematogênica. Apesar destes efeitos não possuem correlação direta, os resultados indicam que as cininas presentes no veneno da vespa *P. paulista* contribuem com a inflamação e dor induzido por venenos desta espécie.

5. CONCLUSÃO

O veneno da vespa social *Polybia paulista* tem sido intensamente investigado, porém somente os peptídeos mais abundantes deste veneno são conhecidos: os mastoparanos Polybia MP-1 e MP-2, o peptídeo quimiotáctico Polybia-CP e o peptídeo Paulistina. Este fato deve-se principalmente à utilização de abordagens clássicas até então, com coletas “*off-line*” em relação às análises de sequenciamento, fazendo com que somente os peptídeos mais abundantes pudessem ser investigados. Com os avanços na área da espectrometria de massas, incluindo o desenvolvimento da tecnologia de analisadores do tipo “*ion-trap*” utilizado no presente trabalho, tornou-se possível a investigação de compostos pouco abundantes, com alta velocidade de aquisição de dados e elevada resolução.

Neste trabalho foi possível a obtenção de um perfil peptídico detalhado do veneno de *P. paulista* por uma abordagem analítica moderna e mais sensível, além de padronizar o sequenciamento destes peptídeos por espectrometria de massas sequencial de maneira totalmente “*on-line*”, fazendo com que estudos posteriores possam utilizar-se da mesma metodologia.

As análises realizadas neste trabalho foram de fundamental importância para elucidar a riqueza peptídica presente no veneno de *P. paulista*, levando em consideração a massa molecular e o tempo de retenção dos compostos presentes nas amostras. Estes estudos revelaram o panorama geral da composição peptídica deste veneno em diferentes ninhos da mesma espécie, e no mesmo ninho em diferentes épocas do ano. A investigação revelou um nível surpreendentemente elevado de variação intraespecífica e permitiu a identificação de novos peptídeos no veneno desta espécie. Foi possível detectar a presença de 108 peptídeos com diferentes tempos de retenção e massas moleculares na amostra A (Ninho 1), 92 peptídeos na amostra B (ninho 2), e 98 peptídeos na amostra C (ninho 3). Quando o veneno de um mesmo ninho (amostra D) foi observado em três épocas diferentes, com intervalos de 60 dias entre cada coleta (D1, D2 e D3), foi possível detectar a presença de 94 peptídeos diferentes na amostra D1, 95 peptídeos na amostra D2, e 78 peptídeos em D3.

O fato das amostras conterem diferenças nas massas moleculares dos peptídeos encontrados pode estar associado à fatores ambientais e genéticos, estes últimos principalmente levando-se em consideração o fato destas vespas possuírem sistemas de acasalamento e organização social complexos. As análises possibilitaram ainda comparações entre amostras diferentes de veneno com altíssima reprodutibilidade, o que também só foi possível através da alta qualidade dos dados gerados.

Através da padronização das técnicas de obtenção e interpretação dos espectros *CID* em instrumentos do tipo ESI-IT-TOF foi possível identificar vários peptídeos presentes no veneno de *P. paulista*, inclusive alguns peptídeos que já haviam sido descritos em trabalhos anteriores com utilização de outras técnicas. A padronização das técnicas de LC-MS em sistema LC-IT-TOF/MS e MSⁿ e o tratamento dos dados espectrais, associados à interpretação dos mesmos, eram os principais objetivos deste projeto, uma vez que este sistema permite a aquisição rápida de dados provenientes de uma amostra a fim de aumentar a biblioteca de compostos. Além de confirmar a presença de três peptídeos já conhecidos para este veneno, novos componentes de famílias peptídicas típicas dos venenos de vespídeos tais como cininas, mastoparanos e peptídeos quimiotáticos, também foram encontrados.

No total, foi possível sequenciar quatorze peptídeos do veneno de *P. paulista*, sendo três já conhecidos e onze inéditos. A estratégia analítica desenvolvida no presente trabalho permitirá sua aplicação imediata no estudo dos venenos de outras espécies de animais.

Além disso, abre-se a possibilidade de que outros projetos possam utilizar a mesma técnica, tanto para comparação entre amostras quanto para identificação de novos compostos presentes em venenos animais. O desenvolvimento das técnicas para análise e interpretação dos cromatogramas de massa e dos espectros de massas sequenciais foi de fundamental importância para que fosse possível identificar os peptídeos novos neste trabalho e ajudar na realização de outros projetos que estão sendo desenvolvidos no laboratório.

Três dos novos peptídeos da família das cininas foram manualmente sintetizados em fase sólida pela estratégia Fmoc, e caracterizados funcionalmente com relação à produção de dor e inflamação em mamíferos. Além disso, estes resultados demonstraram a importância da bioprospecção de produtos naturais a partir de venenos de animais, uma vez que novas moléculas podem ser encontradas e a riqueza e a diversidade desses venenos elucidadas.

O presente projeto, fazendo parte do programa BIOprospecTA/FAPESP alcançou alguns dos principais objetivos do projeto, através da identificação e caracterização de compostos naturais de natureza peptídica, presentes no veneno da vespa social *P. paulista*, autóctone da fauna do Estado de São Paulo. Além de abrir novas vertentes de estudos estruturais e funcionais, o presente projeto alcançou os objetivos inicialmente almejados, identificando e caracterizando estruturalmente moléculas peptídicas, presentes no veneno da vespa social *P. paulista*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZHUBEI, A. A.; STERNBERG, M. J. E. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. **J. Mol. Biol.**, London, v. 229, n. 2, p. 472-493, 1993.

ANTONICELLI, L.; BILO, M. B.; BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, Hagerstown, v. 2, n. 4, p. 341-346, 2002.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 260, n. 3, p. 1437-1444, 1984a.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and cabrolin, from venom of the european hornet, *Vespa cabro*. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 259, n. 16, p. 10106-10111, 1984b.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulation peptides from wasp venom. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 258, n. 22, p. 13697-13702, 1983.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, N. B.; SAIDEMBERG, D. M.; SOUZA, B. M.; CÉSAR-TOGNOLI, L. M. M.; FERREIRA, V. M. R.; MENDES, M. A.; CABRERA, M. P. S.; RUGGIERO NETO, J.; PALMA, M. S. Protonectin (1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaiia pallipes pallipes*. **Toxicon**, Elmsford, v. 56, n. 6, p. 880-889, 2010.

BELEBONI, R. O.; CAROLINO, R. O.; PIZZO, A. B.; CASTELLAN-BALDAN, L.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W. F.; COIMBRA, N. C. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. **Cell. Mol. Neurobiol.**, New York, v. 24, n. 6, p. 707-728, 2004.

BIASS, D.; DUTERTRE, S.; GERBAULT, A.; MENOU, J. L.; OFFORD, R.; FAVREAU, P.; STOCKLIN, R. Comparative proteomic study of the venom of the piscivorous cone snail *Conus consors*. **J. Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 210-218, 2009.

BIEMANN, K., Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). **Methods Enzymol.**, New York, v. 193, p. 886-887, 1990.

BIEMANN, K.; SCOBLE, H. A. Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins. **Science**, Washington, v. 237, n. 4818, p. 992-998, 1987.

BOONEN, K.; LANDUYT, B.; BAGGERMAN, G.; HUSSON, S. J.; HUYBRECHTS, J.; SCHOOF, L. Peptidomics: the integrated approach of MS, hyphenated techniques and bioinformatics for bioactive peptide analysis. **J. Sep. Sci.**, Berkeley, v. 31, n. 3, p. 427-445, 2008.

BRANDTS, J. F.; HALVORSON, H. R.; BRENNAN, M. Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. **Biochemistry**, Washington, v. 14, n. 22, p. 4953-4963, 1975.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, San Francisco, v. 87, n. 1, p. 1-5, 2000.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics: strategy and applications. **J. Mass Spectrom.**, Nashville, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. **Rev. Neurol.**, Barcelona, v. 35, n. 11, p. 1037-1048, 2002.

CEROVSKY, V.; SLANINOVÁ, J.; FUCÍK, V.; HULACOVÁ, H.; JEZEK, R.; BOROVIČKOVÁ, L. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. **Peptides**, New York, v. 29, n. 6, p. 992-1003, 2008.

CHARLES, M. J.; MCLUCKEY, S. A.; GLISH, G. L. Competition between resonance ejection and ion dissociation during resonant excitation in a quadrupole ion trap, **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, Santa Fé, v. 5, n. 12, p. 1031-1041, 1994.

CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N.; MALASPINA, O. Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas. In: BARRAVIEIRA, B. (Ed.) **Venenos animais: uma visão integrada**. 1.ed., Rio de Janeiro: EPUB, 1994, p. 173-193.

CHEN, W.; YANG, X.; YANG, X.; ZHAI, L.; LU, Z.; LIU, J.; YU, H. Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius. **Peptides**, New York, v. 29, n. 11, p. 1887-1892, 2008.

CLYNEN, E.; BAGGERMAN, G.; VEELAERT, D.; CERSTIAENS, A.; VAN DER HORST, D.; HARTHOORN, L.; DERUA, R.; WAELKENS, E.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L. Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust,

Locusta migratoria. **Eur. J. Biochem.**, Palmerstan North, Berlin, v. 268, n. 7, p. 1929-1939, 2001.

CLYNEN, E.; DE LOOF, A.; SCHOOFS, L. The use of peptidomics in endocrine research. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Denver, v. 132, n. 1, p. 1-9, 2003.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; LOPES DE MELO, R.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; SCIANI, J. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; PREZOTO, B. C.; DE CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, A. M. C. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, New York, v. 28, n. 3, p. 515-523, 2007.

CONLON, J. M.; ARONSSON, U. Multiple bradykinin-related peptides from the skin of the frog, *Rana temporaria*. **Peptides**, New York, v. 18, n. 3, p. 361-365, 1997.

CONLON, J. M. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. **Regul. Pept.**, Amsterdam, v. 79, n. 2-3, p. 71-81, 1999.

CORSI, M. C. C. **Estudo dos peptídeos sintéticos em algumas etapas do mecanismo de secreção de insulina por células beta pancreáticas**. 2001. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (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)**. 1996. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

COUNTERMAN, A.E.; CLEMMER, D.E. Cis-Trans Signatures of Proline-Containing Tryptic Peptides in the Gas Phase. **Anal. Chem.**, Washington, v. 74, n. 9, p. 1946-1951, 2002.

COYLE, B.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; GERAGHTY, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. **Biomaterials**, London, v. 16, n. 2, p. 321-329, 2003.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, Jackson, v. 17, p. 589-592, 1991.

CSORDÁS, A.; MICHL, H. Isolation and structure of a hemolytic polypeptide from the defensive secretion of european *Bombina* species. **Monatsh. Chem.**, Viena, v. 101, p. 182-189, 1970.

DANILEKO, M.; WORLAND, P.; CARLSON, B.; SUSVILLE, E. A.; SHARONI, Y. Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein-directed and membrane perturbing activities. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 196, n. 3, p. 1296-1302, 1993.

DAVIS, J.; JONES, A.; LEWIS, R. J. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. **Peptides**, New York, v. 30, n. 7, p. 1222-1227, 2009.

DE GRAAF, D. C.; ALERTS, M.; DANNEELS, E.; DEVREESE, B. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component resolved diagnosis of sting allergy. **J. Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 145-154, 2009.

DE PAULA, L.; SANTOS, W. F.; MALHEIRO, A.; CARLOS, D.; FACCIOLI, L. H. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a model of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 182-189, 2005.

DE SOUZA, B. M. **Peptídeos policatiônicos do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Polistinae): estrutura e função**. 2002. 121f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

DE SOUZA, B. M. **Estrutura e função de mastoparanos dos venenos de vespas**. 2006. 115f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

DE SOUZA, B. M.; DA SILVA, A. V.; RESENDE, V. M.; ARCURI, H. A.; DOS SANTOS CABRERA, M. P.; RUGGIERO NETO, J.; PALMA, M. S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, New York, v. 30, n. 8, p. 1387-1395, 2009.

DE SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; MENDES, M. A.; PALMA, M. S. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 18, n. 10, p. 1095-1102, 2004.

DE SOUZA, B. M.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D.; MARQUES, M. R.; CÉSAR, L. M. M.; ALMEIDA, R. N. A.; PAGNOCCA, F. C.; KONNO, K.; PALMA, M. S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, New York, v. 26, n. 11, p. 2157-2164, 2005.

DODONOV, A. F.; KOZLOVSKI, V. I.; SOULIMENKOV, I. V.; RAZNIKOV, V. V.; LOBODA, A. V.; ZHEN, Z.; HORWATH, T.; WOLLNIK, H. High-resolution electrospray

ionization orthogonal injection time-of-flight mass spectrometer. **Eur. J. Mass Spectrom.**, Palmerstan North, v. 6, p. 481-490, 2000.

DOHTSU, K.; OKUMURA, K.; PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera – Vespidae). **Nat. Toxins**, New York, v. 1, n. 5, p. 271-276, 1993.

DONGRE, A. R.; JONES, J. L.; SOMOGYI, A.; WYSOCKI, V. H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model. **J. Am. Chem. Soc.**, Salt Lake City, v. 118, p. 8365-8374, 1996.

DREXLER, D. M.; BELCASTRO, J. V.; DICKINSON, K. E.; EDINGER, K. J.; HNATYSHYN, S. Y.; JOSEPHS, J. L.; LANGISH, R. A.; MCNANEY, C. A.; SANTONE, K. S.; SHIPKOVA, P. A.; TYMIAK, A. A.; ZVYAGA, T. A.; SANDERS, M. An automated high throughput liquid chromatography-mass spectrometry process to assess the metabolic stability of drug candidates. **Assay Drug Dev. Technol.**, New York, v. 5, n. 2, p. 247-264, 2007.

EDERY, H.; ISHAY, J.; GITTER, S.; JOSHUA, H. Venoms of Vespidae. In: BETTINI, S. **Arthropod venoms**. New York, Springer-Verlag, 1978, p. 691-771

ENO, A. E. Pharmacological investigation of oedema induced by venom from the wasp *Polistes fuscatus*. **Toxicon**, Elmsford, v. 35, n. 12, p. 1691-1698, 1997.

ESCOUBAS, P., CELERIER, M. L., NAKAJIMA, T. High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma*: chemotaxonomic and biochemical applications. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 11, n. 17, p. 1891-1899, 1997.

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G. M. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, Nashville, v. 43, n. 3, p. 279-295, 2008.

ESCOUBAS, P.; SOLLID, B. L.; KING, G. F. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. **Toxicon**, Elmsford, v. 47, n. 6, p. 650-63, 2006.

FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A. C. M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, n. 4, p. 554-563, 2004.

FERREIRA, L. A. F.; LUCAS, S.; ALVES, E. W.; HERMANN, V. V.; REICHL, A.; HABERMEHL, G. Isolation, characterization and biological properties of two kinin-like peptides (peptide-S and peptide-R) from *Scaptocosa raptoria* venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 36, n. 1, p. 31-39, 1998.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. Hymenoptera stings. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.** Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 194-204, 2006.

FONTANA, R.; MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; KONNO, K.; CÉSAR, L. M. M., MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides**, New York, v. 25, n. 6, p. 919-928, 2004.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**, Washington, v. 177, n. 46, p. 314-322, 1972.

HANKS, G. W.; CONNO, F.; CHERNY, N.; HANNA, M.; KALSO, E.; MCQUAY, H. J.; MERCADANTE, S.; MEYNADIER, J.; POULAIN, P.; RIPAMONTI, C.; RADBRUCH, L.; CASAS, J. R.; SAWE, J.; TWYXCROSS, R. G.; VENTAFRIDDA, V. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. **Br. J. Cancer**, London, v. 84, n. 5, p. 587-593, 2001.

HIDE, I.; BENNET, J. P.; PIZZEY, A.; BOONEN, G.; SAGI, D. B.; GOMPERS, B. D.; TATHAM, P. E. R. Degranulation of individual mast cell in response to Ca²⁺ and guanine nucleotides: an all-or-none event. **J. Cell Biol.**, New York, v. 123, n. 3, p. 585-593, 1993.

HIGASHIJIMA, T.; BURNIER, J.; ROSS, E. M. Regulation Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 265, n. 24, p. 14176-14186, 1990.

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.**, Tokyo, v. 27, n. 8, p. 1945-1946, 1979a.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; FUJINO, M.; KITADA, C. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 27, n. 8, p. 1942-4, 1979b.

HO, C. L.; CHEN, W. C.; LIN, Y. L. Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the blackbellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 36, n. 4, p. 609-617, 1998.

HO, C. L.; HWANG, L. L.; LIN, Y. L.; CHEN, C. T.; YU, H. M.; WANG, K. T. Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requirements. **Eur. J. Pharmacol.** Amsterdam, v. 259, n. 3, p. 259-264, 1994.

HOFFMAN, D. R. Hymenoptera Venom Allergens. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, Heidelberg, v. 30, n. 2, p. 109-128, 2006.

HUNG, C. W.; SCHLOSSER, A.; WEI, J.; LEHMANN, W. D. Collision-Induced reporter fragmentations for identification of covalently modified peptides. **Anal. Bioanal. Chem.**, Berlin, v. 389, n. 4, p. 1003-1016, 2007.

HUNT, D. F.; YATES, J. R.; SHABANOWITZ, J.; WINSTON, S.; HAUER, C. R. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 83, n. 17, p. 6233-6237, 1986.

JACOX, A.; CARR, D. B.; PAYNE, R. New clinical-practice guidelines for the management of pain in patients with cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 330, n. 9, p. 651-655, 1996.

JAQUES, R.; SCHACHTER, M. The presence of histamine, 5-hydroxytryptamine and a potent slow contracting substrate in wasp venom. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, London, v. 9, n. 1, p. 53-57, 1954.

JOHNSON, A. R.; ERDOS, E. G. Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v. 142, n. 4, p. 1252-1256, 1973.

JOHNSON, J. V.; YOST, R. A. Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: triple quadrupoles and quadrupole ion traps. **Anal. Chem.**, Chapel Hill, v. 62, n. 20, p. 2162-2172, 1990.

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptídeos na pele. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 483-498, 2003.

KATSU, T. C.; NINOMIYA, M.; KUROKO, H.; KOBAYASHI, T.; HIROTA, T.; FUJITA, Y. Action mechanism of amphipathic peptides gramicidin S and melittin on erythrocyte membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 939, n. 1, p. 57-63, 1988.

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.**, Tokyo, v. 24, n. 11, p. 2896-2897, 1976.

KLEINBAUM, D. G.; KUPPER, L. L.; MULLER, K. E.; NIZAM, A. **Applied regression analysis and other multivariable methods (3rd ed.)**. Belmont: Thomson Brooks/Cole Publishing Co., 1998, p. 589-638.

KRISHNAMURTHY, T.; PRABHAKARAN, M.; LONG, S. R. Mass spectrometric investigations on *Conus* peptides. **Toxicon**, Elmsford, v. 34, n. 11-12, p. 1345-1359, 1996.

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, v. 38, n. 11, p. 1505-1515, 2000.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Ver. Drug Discov.**, London, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LORENZI, C. C. B. **Estudo Estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias**. 2002. 115p. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. Influence of proline residues on protein conformation. **J. Mol. Biol.**, London, v. 218, n. 2, p. 397-412, 1991.

MALONE, J.; TRAUTMANN, M.; WILHELM, K.; TAYLOR, K.; KENDALL, D. M. Exenatide once weekly for the treatment of type 2 diabetes. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, London, v. 18, n. 3, p. 359-367, 2009.

MARANGONI, S.; BORGES, N. C.; MARANGONI, R. A.; ANTUNES, E.; VIEIRA, C. A.; NOVELLO, J. C.; DOMONT, G. B.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phenutria nigriventris* (armed spider) venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 31, n. 4, p. 377-384, 1993.

MATHIAS, A. P.; SCHACHTER, M. The chromatographic behavior of wasp venom kinin, kallidin and bradykinin. **Br. J. Pharmacol. Chemother**, London, v. 13, n. 3, p. 326-9, 1958.

MATSUAKI, K. K.; YONEYAMA, S.; MURASE, O.; MIYAJIMA, K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. **Biochemistry**, v. 35, n. 25, p. 8450-8456, 1996.

MEDZIHRADESKY, K. F. Peptide Sequence Analysis. **Methods Enzymol.**, New York, v. 402, p. 209-244, 2005.

MELETIADIS, J.; MEIS, J. G. M.; MOUTON, J. W.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 8, p. 2949-2954, 2000.

MELLOR, I. R.; SANSOM, M. S. Ion-channel properties of mastoparan, a 14-residue peptide from wasp venom, and of MP3, a 12-residue analogue. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.**, London, v. 239, n. 1296, p. 383-400, 1990.

MELLOR, I. R.; USHERWOOD, P. N. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. **Toxicon**, Elmsford, v. 43, n. 5, p. 493-508, 2004.

MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S. 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.**, London, v. 18, n. 6, p. 636-642, 2004a.

MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, Elmsford, v. 44, n. 1, p. 67-74, 2004b.

MENDES, M. A., SOUZA, B. M., PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 1, p. 101-106, 2005.

MENDES, M. A.; PALMA, M. S. Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Peptides**, New York, v. 27, n. 11, p. 2632-2639, 2006.

MERRIFIELD, B. Solid-Phase synthesis. **Science**, Washington, v. 232, n. 4748, p. 341-347, 1986.

MILJANICH, G. P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Curr. Med. Chem.**, Sharjah, v. 11, n. 23, p. 3029-3040, 2004.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; CAROLINO, R. O.; COUTINHO-NETTO, J.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; COIMBRA, N. C.; DOS SANTOS, W. F. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 151, n. 6, p. 860-869, 2007.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; DE OLIVEIRA, L.; VIEIRA, E. B.; GELFUSO, E. A.; 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.**, Odense, v. 97, n. 5, p. 289-295, 2006.

MOURELLE, D. **Estudos sobre a atividade nociceptiva/antinociceptiva de peptídeos isolados do veneno bruto de abelhas *Apis mellifera***. 2011. 48p. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

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, v. 29, n. 12, p. 2493-2497, 2006.

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. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 168, n. 2, p. 844-849, 1990.

NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: PIEK, T. **Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioural aspects**. London, Academic Press Inc. Ltd., 1986, p. 309-327.

NEWTON, K. A.; CLENCH, M. R.; DESHMUKH, R.; JEYASEELAN, K.; STRONG, P. N. Mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of the Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*: biotope-specific variation in the expression of venom peptides. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 21, n. 21, p. 3467-3476, 2007.

OLIVEIRA, M. R. **Fracionamento e caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Polybia paulista***. 2000. 100f. Dissertação (Mestrado em Biológica Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

OLSON, E. J. *Parachartergus fraternus* (Gribodo) (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) uses venom when taking caterpillar prey. **Psyche**, Stuttgart, v. 103, n. 1-2, p. 85-93, 2000.

PALMA, M. S. Insect venom peptides. In: KASTIN, A. J. **Handbook of biologically active peptides**. 1st ed., Oxford: Academic Press, 2006, p. 389-396.

PARK, N. G.; 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, v. 36, n. 6, p. 793-801, 1995.

PELEGRINI, M.; MAMMI, S.; PEGGION, E.; MIERKE, D. F. Threonine6-bradykinin: structural characterization in the presence of micelles by nuclear magnetic resonance and distance geometry. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 40, n. 1, p. 92-98, 1997.

PELEGRINI, M.; MIERKE, D. F. Threonine6-Bradykinin: molecular dynamics simulations in abiphasic membrane mimetic. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 40, n. 1, p. 99-104, 1997.

PÉREZ-PAYÁ, E.; DUFOURCQ, J.; BRACO, L.; ABAD, C. Structural characterization of the natural membrane-bound state of melittin: a fluorescence study of a dansylated analogue. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1329, n. 2, p. 223-236, 1997.

PÉREZ-PAYÁ, E.; HOUGHTEN, R. A.; BLONDELLE, S. E. The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 270, n. 3, p. 1048-1056, 1995.

PFEIFFER, D.; GUDZ, T. I.; NOVGORODOV, S. A.; ERDAHL, W. L. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 270, n. 9, p. 4923-4932, 1995.

PICOLO, G.; HISADA, M.; MOURA, A. B.; MACHADO, M. F.; SCIANI, J. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; MELO, R. L.; OLIVEIRA, V.; LIMA-LANDMAN, M. T.; CURY, Y.; KONNO, K.; HAYASHI, M. A. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 478-486, 2010.

PIEK, T.; HUE, S.; MANTEL, P.; NAKAJIMA, T.; PELHATE, M.; YASUHARA, T. Threonine-6-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 157-162, 1991.

PIEK, T.; ROCCHI, R.; HUE, B. Wasp kinin analogues - a lead to new drugs and pesticides. **Toxicon**, Elmsford, v. 35, n. 4, p. 476-477, 1997.

PIMENTA, A. M.; STOCKLIN, R.; FAVREAU, P.; BOUGIS, P. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 15, n. 17, p. 1562-1572, 2001.

PIMENTA, A. M.; RATES, B.; BLOCH, C. Jr.; GOMES, P. C.; SANTORO, M. M.; DE LIMA, M. E.; RICHARDSON, M.; CORDEIRO, M. N. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides

from *Phoneutria nigriventer* (Aranea, Ctenidae) venom. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 19, n. 1, p. 31-37, 2005.

PISANO, J. J. Kinins in non-mamalian origin. **Handbook of Experimental Pharmacology**, New York, Springer, v. 25, 1970, p 589-95.

PISANO, J. J. Kinins in Nature. **Handbook of Experimental Pharmacology**, New York, Springer, v. 25, 1979, p. 273-285.

PRENTICE, B. M.; XU, W.; OUYANG, Z.; MCLUCKEY, S. A. DC Potentials Applied to an End-cap Electrode of a 3-D Ion Trap for Enhanced MS Functionality. **Int J Mass Spectrom.**, Amsterdam, v. 306, n. 2-3, p. 114-122, 2011.

RIBEIRO, S. P.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D.; DE SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; DE AZEVEDO, W. F.; PALMA, M. S. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, New York, v. 25, n. 12, p. 2069-2078, 2004.

ROCHA, E.; SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 156, n. 2, p. 261-273, 1949.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. **Biomed. Mass Spectrom.**, London, v. 11, n. 11, p. 601, 1984.

SCHACHTER, M. Introduction to kinins: a group of vasoactive peptides. **Fed. Proc.**, New York, v. 27, n. 1, p. 49-51, 1968.

SCHWARZ, G.; BLOCHMANN, U. Association of the wasp venom peptide mastoparan with electrically neutral lipid vesicles. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 318, n. 2, p. 172-6, 1993.

SCHULZ-KNAPPE, P.; ZUCHT, H. D.; HEINE, G.; JURGENS, M.; HESS, R.; SCHRADER, M. Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. **Comb. Chem. High Throughput Screen**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 207-217, 2001.

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo Sequencing of Peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634-649, 2010.

SHEN, G. S.; LAYER, R. T.; McCABE, R. T. Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. **Drug Discov. Today**, London, v. 5, n. 3, p. 98-106, 2000.

SHIPKOVA, P.; DREXLER, D. M.; LANGISH, R.; SMALLEY, J.; SALYAN, M. E.; SANDERS, M. Application of ion trap technology to liquid chromatography/mass spectrometry quantitation of large peptides. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 22, n. 9, p. 1359-1366, 2008.

SMITH, J.A.; PEASE, L.G. Reverse turns in peptides and proteins. **CRC Crit Rev Biochem.**, London, v. 8, n. 4, p. 315-99, 1980.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, Berlin, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

STEEN, H.; KUSTER, B.; MANN, M. Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning. **J. Mass Spectrom.**, Nashville, v. 36, n. 7, p. 782-790, 2001.

STEEN, C. J.; JANNIGER, C. K.; SCHUTZER, S. E.; SCHWARTZ, R. A. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. **Int. J. Dermatol.**, Philadelphia, v. 44, n. 2, p. 91-94, 2005.

STOCKLIN, R.; FAVREAU, P. Proteomics of Venom Peptides. In: MÉNEZ, A. **Perspectives in Molecular Toxinology**, Chichester: England John Wiley and Sons, Ltd., 2002, p. 107-123.

STOCKLIN, R.; FAVREAU, P.; THAI, R.; PFLUGFELDER, J.; BULET, P.; MEBS, D. Structural identification by mass spectrometry of a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary bee *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae). **Toxicon**, Elmsford, v. 55, n. 1, p. 20-7, 2009.

TABB, D. L.; SMITH, L. L.; BRECI, L. A.; VYSOCKI, V. H.; LIN, D.; YATES, J. R. Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. **Anal. Chem.**, Chapel Hill, v. 75, n. 5, p. 1155-1163, 2003.

TEIXEIRA, C. G.; PICCOLI, A.; COSTA, P.; SOARES, L.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Involvement of the nitric oxide/soluble guanylate cyclase pathway in the anti-oedematogenic action of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 58, n. 5, 667-675, 2006.

TUICHIBAEV, M. U.; AKHMEDOVA, N. U.; KAZAKOV, I.; KORNEEV, A. S.; GAGEL'GANS, A. I. Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*, structure and function. **Biokhimiia**, Moskva, v. 53, n. 2, p. 219-226, 1988.

UNDENFRIEND, S.; NAKAJIMA, T.; PISANO, J. J. Structure of the major kinin in wasp (*Polistes*) venom. **Proc. 7th Int. cong. Biochem.**, Tokyo, VIII, v. 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.**, Tokyo, v. 37, 1977.

VON HEIJNE, G. Proline kinks in transmembrane alpha-helices. **J. Mol. Biol.**, London, v. 218, n. 3, p. 499-503, 1991.

XU, X.; LI, J.; LU, Q.; YANG, H.; ZHANG, Y.; LAI, R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 47, n. 2, p. 249-53, 2006.

WANG, C. Z.; CHIN, C. W. Conus peptides: a rich pharmaceutical treasure. **Acta Biochim. Biophys Sin.**, Shanghai, v. 36, n. 11, p. 713-723, 2004.

WANG, K. R.; ZHANG, B. Z.; ZHANG, W.; YAN, J. X.; LI, J.; WANG, R. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, New York, v. 29, n. 6, p. 963-968, 2008.

WATANABE, M.; YASUHARA, T.; NAKAJIMA, T. Occurrence of thr6-bradikinin and its analogous peptide in the venom of *Polistes Rothneyi iwatai*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAI, Y. **Animal, Plant and Microbial Toxins**, New York: Plenum, 1976, v. II, p. 105-112.

WILMOT, C. M.; THORNTON, J. M. Analysis and prediction of the different types of beta-turn in proteins. **J. Mol. Biol.**, London, v. 203, n. 1, p. 221-32, 1988.

WONG, P. S. H.; COOKS, R. G. Ion Trap Mass Spectrometry. **Curr. Sep.**, New York, v. 16, p. 85-92, 1997.

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**, Elmsford, v. 25, n. 5, p. 527-535, 1987.

YASUHARA, T.; NAKAJIMA, T.; ERSPAMER, V. Isolation and sequence analysis of peptides in the picomolar level. In: SAKAKIBARA, S. **Peptide Chemistry: Structure and activity of chemotactic peptide from the venom sac of Vespinae**, Osaka: Protein Research Foundation, 1983, p. 213-218.

YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T. Chemical investigation of the hornet (*Vespa xanthoptera Cameron*) venom. The structure of a new bradkinin analogu "Vespakinin-X". **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 25, n. 5, p. 935-941, 1977.

YSHII, L. M.; SOUZA, G. H. M. F.; CAMARGO, E. A.; EBERLIN, M. N.; RIBELA, M. T. P.; MUSCARA, M. N.; HYSLOP, S.; COSTA, S. K. P. Characterization of the mechanisms underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. **Toxicon**, Elmsford, v. 53, n. 1, p. 42-52, 2009.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.