
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

*Efeito das Interações Peptídeo-Peptídeo e Peptídeo-Membrana nas
Atividades Funcionais de Toxinas Peptídicas do Veneno da Vespa Social
Agelaia pallipes pallipes (Hymenoptera, Vespidae)*

NICOLI BARÃO BAPTISTA SAIDEMBERG

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).

JANEIRO-2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

*Efeito das Interações Peptídeo-Peptídeo e Peptídeo-Membrana nas
Atividades Funcionais de Toxinas Peptídicas do Veneno da Vespa Social
Agelaia pallipes pallipes (Hymenoptera, Vespidae)*

NICOLI BARÃO BAPTISTA SAIDEMBERG

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO SERGIO PALMA

Diissertação 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).

JANEIRO-2007

Ofereço esse trabalho,

*Para vocês, Luis e Maria, meus pais,
Que investiram em mim
E agora participam de mais uma alegria.*

*E para você, Daniel, meu esposo,
Que além de me completar,
Torna a vida muito mais gostosa de ser vivida.*

"Conta-se que no século passado, um turista americano foi a cidade do Cairo no Egito, com o objetivo de visitar um famoso sábio. O turista ficou surpreso ao ver que o sábio morava num quartinho muito simples e cheio de livros. As únicas peças de mobília eram uma cama, uma mesa e um banco. - Onde estão seus móveis? - perguntou o turista. E o sábio, bem depressa, perguntou também: - E onde estão os seus...? - Os meus?! - surpreendeu-se o turista - Mas eu estou aqui só de passagem! - Eu também... - concluiu o sábio."

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **D-us**, pelas bênçãos depositadas em meu caminho;

A **todas as pessoas** que me auxiliaram neste trabalho;

Ao meu orientador **Prof. Dr. Mario Sergio Palma**, pela generosidade em partilhar seus conhecimentos, pela paciência, pela amizade e, principalmente, pela confiança em mim depositada;

Ao meu “maridon”, **Daniel M. Saidemberg**, companheiro e amigo, que me mostrou o que existe de mais importante nesse mundo, pelo incentivo, carinho e paciência, e participante de mais esta felicidade;

Aos meus pais, **Luis Antônio** e **Maria Aparecida**, amor incondicional, por todo apoio dado durante esses anos da minha vida, permitindo, sempre que possível, que eu conhecesse lugares diferentes, o que contribuiu para minha formação, principalmente como pessoa;

Aos meus irmãos, **Fellipe** e **Bruno**, pelo apoio e incentivo nessa caminhada e pelos momentos agradáveis em família;

Aos meus “cumpadres”, **Lílian** e **Francisco** (e **Mateus**): ótimas pessoas que conheci e que se tornaram amigos, com os quais dividimos principalmente momentos de alegria;

Aos colegas de trabalho, **Maria Anita, Roberta, Bibiana, Lucilene, Keity, Maurício, Paulo, Luis Carlos, Roberto, Tatiane, Meire, Virgínia, Nathalia** e **Alessandra**, pela colaboração em todos os momentos, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração;

Aos meus amigos de Campinas **Zilber, Dú, Davi, Nathan, Débora, Carol Simone, Maria Regina, Camila e Valéria**, pelos fins de semana sempre muito agradáveis e, principalmente, pela amizade sincera que perdura por tantos anos;

Aos meus amigos de casa, **Jane, Toquinho, Mel e Eva**, amigos eternos;

A **Heloisa, Sérgio Pascon e todos os funcionários da UNESP**, que também foram muito importantes na realização deste trabalho e sem os quais nenhum outro trabalho seria possível;

Aos técnicos do Biotério do ICB-II, **Beto e China**, pelo auxílio prestado;

Às **vespas *Agelaia pallipes pallipes* e ratos Wistars** sem os quais esse trabalho não seria possível;

E, finalmente, ao **CNPq e Fapesp**, pelo auxílio financeiro importantes para o desenvolvimento deste trabalho;

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micra (Micrometro)
μM	Micromolar
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Soro Albumina Bovina
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Ca^{+2}	Íon Cálcio
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
C-18	Octadecil
cm^3	Centímetros Cúbicos
CP	Peptídeo Quimioctático
EMP-AF	Eumenine Mastoparano AF
ESI	Ionização por spray de elétrons
Fmoc	Fluorenyl-methoxy-carbonyl
g	Gramma
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
h	Hora
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilovolt
L	Litro
LDH	Enzima Lactato Desidrogenase
M	Molar
MCD	<i>Mast Cell degranulation</i>
MCM	<i>Mast Cell medium</i>

MeCN	Acetonitrila
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/z	Massa/carga
MP	Mastoparano
MS	Espectrometria de massas
MS-MS	Espectrometria de massas seqüenciais (<i>tandem</i>)
m/v	massa/volume
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PTH-Aminoácido	Feniltiohidantoína - aminoácido
rpm	Rotações por minuto
SH	Solução de p-nitrofenil-N-acetil-b-glucosaminidina
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Hidroximetilaminometano
Triton X-100	t-octilfenoxipolietanol
V	Volt
v/v	Volume/Volume

LISTA DE ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDO	CÓDIGO DE 3 LETRAS	CÓDIGO DE 1 LETRA
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Cisteína	Cis	C
Fenilalanina	Phe	F
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

ÍNDICE

<i>Assunto</i>	<i>Páginas</i>
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Os constituintes dos venenos de Himenópteros	8
2.1.1 Compostos de Alta Massa Molecular	8
2.1.2 Compostos de Baixa Massa Molecular	9
2.1.3 Compostos Peptídicos	10
2.1.3.1 As Cininas	10
2.1.3.2 Os Mastoparanos	11
2.1.3.3 Os Peptídeos Quimiotáticos	17
2.2 Interação entre Peptídeos e Membranas Biológicas	19
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Material biológico	
4.2 Extração e Liofilização do veneno	
4.3 Cromatografia de Fase Reversa Sob Alta Performance	
4.4 Espectrometria de massas	
4.6 Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman	
4.7 Síntese manual de peptídeos em fase sólida	
4.8 Atividade hemolítica	
4.9 Atividade Degranuladora de Mastócitos	
4.10 Atividade Lactato Desidrogenase	
4.10 Atividade Quimiotática	
4.11 Dicroísmo Circular	
4.12 Análises Estatísticas	
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 Separação e Purificação das Frações FR-2 e FR-6	
5.2 Controle de Qualidade das Frações	
5.3 Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman	
5.4 Síntese manual de peptídeos em fase sólida	
5.5 Atividades Biológicas	
5.5.1 Atividade hemolítica e Análises Estatísticas	
5.5.2 Atividade Degranuladora de Mastócitos e Análises Estatísticas	

5.5.3 Atividade Lactato Desidrogenase e Análises Estatísticas	
5.5.4 Atividade Quimiotática e Análises Estatísticas	
5.6 Dicroísmo Circular	
6 CONCLUSÕES	51
7 BIBLIOGRAFIA	54

RESUMO

Os venenos de Vespidae são importantes ferramentas para a defesa dos ninhos. Acidentes com ferroadas de vespas sociais são muito comuns e podem causar diversos sintomas nas vítimas. Esses venenos são ricos em peptídeos policatiônicos, geralmente envolvidos em processos inflamatórios. Os peptídeos mais abundantes encontrados nos venenos das vespas são os peptídeos quimiotáticos e mastoparanos, porém dentre os diversos componentes encontrados no veneno da vespa social *A. p. pallipes* ainda existem algumas toxinas pouco caracterizadas farmacologicamente. Entre elas encontrou-se os peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) com massas moleculares de 1209 Da (I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L-NH₂) e 628 Da (I-L-G-T-I-L-NH₂), respectivamente. Ao nível molecular, esses peptídeos interagem entre si, resultando na potenciação das atividades funcionais da Protonectina. Considerando-se a importância deste tipo de interação molecular para a indução de processos inflamatórios, os objetivos deste estudo foram: caracterizar a estrutura secundária desses peptídeos individualmente e também a estrutura supramolecular resultante de suas interações, observando os efeitos da mesma sobre as ações de degranulação de mastócitos, quimiotaxia e hemólise. Ambos os peptídeos foram sintetizados manualmente em fase sólida por química Fmoc. A Protonectina é um peptídeo anfifílico, enquanto que a Protonectina (1-6) é muito pequena para assumir estrutura secundária anfifílica. Análises de Dicroísmo Circular, revelaram que na presença de TFE, a Protonectina e Protonectina (1-6) tendem a apresentar estrutura secundária constituída de 36.7% e 17.6% na forma de hélice- α , respectivamente. Entretanto, a mistura de ambos peptídeos na proporção de 1:1 resultou em uma estrutura supramolecular que apresentou 48.3% de hélice- α sugerindo, assim, uma possível interação entre esses dois peptídeos. Esses resultados dão suporte aos demais ensaios realizados cujos resultados foram: (1) a Protonectina apresentou atividades hemolítica, degranuladora e de liberação de LDH de mastócitos e elevada atividade quimiotática, características de interação com proteína G; (2) a Protonectina (1-6) apresentou atividade quimiotática (característica de interação com proteína-G), e nenhuma atividade hemolítica, degranuladora e de liberação de LDH; (3) a mistura de ambos peptídeos na proporção estequiométrica 1:1, resultou em grande potenciação das atividades

hemolítica, degranuladora de mastócitos e de liberação de LDH de mastócitos (características de interação com membranas), ao mesmo tempo em que essa mistura causa uma diminuição significativa na atividade quimiotática da Protonectina (1-6). Devido ao fato da seqüência de aminoácidos da Protonectina (1-6) corresponder aos seis primeiros resíduos de aminoácidos encontrados na seqüência primária da Protonectina, essa seqüência conteria o motivo estrutural responsável pelo efeito quimiotático detectado. Aparentemente, o peptídeo Protonectina sozinho estaria atuando através da ativação de receptores acoplados à proteínas-G. O peptídeo Protonectina (1-6) estaria interagindo com a Protonectina, formando uma supra estrutura estável, que passaria a atuar através da perturbação da estrutura das membranas das células animais, causando a lise das mesmas.

ABSTRACT

The venoms of Vespidae are important tools for nest defense. Social wasp stinging accidents are very common and can cause diverse symptoms to the victims. These venoms are rich in polycationic peptides, generally involved in inflammatory processes. The most abundant peptides found in wasp venoms are the mastoparans and chemotactic peptides. However, among the diverse peptidic components found in the venom of *A. p. pallipes* there are some toxins still not well characterized. Among them were found the Protonectin (MW 1209 Da; I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L-NH₂) and Protonectin(1-6) (MW 628 Da; I-L-G-T-I-L-NH₂) peptides. These peptides interact to each other at molecular level potentiating the activities of Protonectin. Considering the importance of this interaction, the objectives of this study were: to characterize the secondary structure of these peptides individually and also the supramolecular structure resulting from their interaction, observing the biological effects of this supramolecular structure on mast cell degranulation, hemolysis and chemotaxis. Both peptides were manually synthesized by using manual solid phase Fmoc Chemistry. The Protonectin is probably an amphiphilic peptide, while Protonectin (1-6) is too small to assume this conformation. Circular Dichroism analysis, in presence of TFE, revealed that Protonectin and Protonectin (1-6) tend to form 36.7% and 17.6% of α -helix, respectively. However, the mixture of both peptides at the proportion 1:1 resulted in a supramolecular structure presenting 48.3% of α -helix, suggesting an interaction between the peptides mentioned above. The results and conclusions obtained in this study were: (1) the Protonectin presented hemolytic activity; caused mast cell degranulating, LDH release from mast cells and presented high chemotactic activity (characteristic of G-protein interaction); (2) the Protonectin (1-6) only presented chemotactic activity (characterized by G-protein interaction) and none hemolytic, mast cell degranulating and LDH release from mast cells; (3) the mixture of both peptides in the stoichiometric proportion 1:1, resulted in strong potentialization of hemolytic activity, mast cell degranulation and LDH release (characterized by peptide-membrane interaction), at the same time that causes a significant decreasing of the chemotactic activity of Protonectin (1-6). Due to the fact that the sequence of Protonectin (1-6) corresponded to the first six

aminoacids residues sequence of Protonectin, this sequence seems to contain the structural motif responsible by the chemoattractant effect. Aparently, the Protonectin alone acts throught the activation of protein-G coupled receptors. The Protonectin (1-6) interact with the Protonectin forming a stable supramolecular structure, capable to disturb the animal cell membrane, causing lysis.

1 INTRODUÇÃO

Os insetos, juntamente com os crustáceos, milípedes e outros artrópodes, compõem cerca de 70% das espécies existentes no planeta, sendo que os membros da Classe Insecta, sozinhos, possuem diversidade maior que qualquer outro animal terrestre já descrito até os dias hoje. Os insetos possuem uma incrível capacidade de adaptação podendo ser pragas de lavouras, “pragas urbanas” e vetores de doenças (MEINWALD, 2000).

Entretanto, esses animais também são necessários na polinização de muitas espécies de valor econômico para a agricultura e exportação de produtos derivados da produção de mel além de serem predadores naturais de outros insetos, fontes de veneno com valor terapêutico, entre outras características (GILLASPY, 1982, In: BREED *et al.*, 1982).

Um dos maiores motivos para o sucesso deste grupo, além das características morfológicas, é o fato de possuírem um vasto arsenal químico existente em seus venenos e secreções corpóreas, que é utilizado na defesa contra predadores. Em geral, os insetos possuem a capacidade de metabolizar compostos orgânicos oriundos de plantas, que são adquiridos por meio de sua dieta alimentar e tornam-se potencialmente úteis no mecanismo de defesa desses organismos (MEINWALD, 2000).

Os insetos são, portanto, verdadeiros “químicos orgânicos” capazes de controlar os gastos energéticos relacionados à produção e utilização de suas secreções químicas utilizadas como ferramentas de caça e defesa, uma outra característica importante que

também garantiu o sucesso desse grupo de animais (WIGGER *et al*, 2002; KING, 2004).

Desde o tempo dos Hebreus, Gregos e Egípcios há relatos da importância econômica dos insetos sociais (WILSON, 1982; In: BREED *et al*, 1982). No antigo Egito, existem figuras documentando a morte do Faraó Menes por ataques destes animais. No entanto, somente dezenove séculos após o início da Era Cristã (ou Era Comum), os venenos desses animais despertaram o interesse de pesquisadores (SPRADBERY, 1973).

Esses insetos sociais são importantes por serem um grupo divergente com distribuição cosmopolita, e pelo fato de existirem muitas castas, divisão de trabalho e sistema genético haplodiplóide, os Himenópteros representam um sistema único de estudos de seleção parental (ARÉVOLA *et al*, 2004).

Mais de 200.000 espécies de vespas, abelhas e formigas formam a Ordem Hymenoptera (EDERY *et al*, 1978). Dentro dessa Ordem, temos a Sub-ordem Apocrita, a Superfamília Vespoidea que se divide nas seguintes Famílias: Formicidae, Mutilidae, Pompilidae, Rhopalosomatidae, Sapygidae, Scoliidae, Sierolomorphidae, Tiphiidae e Vespidae. Esta última se divide em seis Subfamílias: Emeninae, Euparagiinae, Masarinae, Polistinae, Stenogastrinae, Vespinae. Em Vespidae, encontramos as verdadeiras vespas sociais, que constroem colônias, possuem apenas uma rainha e são predadoras de larvas de Lepidoptera, Coleóptera e outras presas, assim como ocorre com vespas solitárias (EVANS e EBERHARD, 1970; BROTHERS *et al*, 1975; EDERY *et al.*, 1978; NAKAJIMA, 1986; HERMAN e BLUM, 1981; CHAUD-NETTO *et al.*, 1994; RASNITSYN e QUICKE, 2002).

As vespas sociais, em geral, reagem diferentemente aos acontecimentos ao redor de seus ninhos e tendem a atacar os intrusos que se aproximam (EDERY *et al.*, 1978) injetando seu veneno por meio de ferroadas seguidas, podendo ocasionar acidentes com reações diversas, como: dores prolongadas, edema, eritema local, urticária, ulceração, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, tonturas, taquicardia, diarreia, perda dos reflexos, reações alérgicas e até mesmo anafilaxia. A dor pode continuar por várias horas e a ardência por alguns dias. Também se observa a liberação de histamina a partir da degranulação de mastócitos e de catecolaminas de células adrenais; pode-se ainda observar citólise, hemólise e quimiotaxia de macrófagos

e leucócitos polimorfonucleares para o local da ferroadada (HABERMANN, 1972; EDERY *et al.*, 1978; OLIVEIRA, 2000; LORENZI, 2002; PARK, 2002).

Até meados das décadas de 70-80 os fatores que regem a liberação de histamina em Vespidae ainda não estavam bem estabelecidos. Alguns componentes como proteases, fosfolipases e cininas que individualmente ou em conjunto estavam relacionados com a liberação de histamina, ainda não tinham seus mecanismos de ação bem conhecidos. Entretanto, naquela época, atribuiu-se às cininas uma grande importância em relação à atividade de liberação de histamina dos mastócitos periféricos (EDERY *et al.*, 1978).

As pesquisas realizadas até o momento sobre a estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação do veneno bruto e/ou toxinas isoladas dos venenos de Hymenoptera sociais, evidenciam a presença de efeitos importantes sob o ponto de vista médico, farmacológico e imunológico, desencadeados pelas toxinas de tais venenos (OLIVEIRA, 2000). A grande maioria das mortes causadas por ferroadas de Hymenoptera sociais está diretamente relacionada ao desencadeamento de reações imunológicas, porém algumas se devem à toxicidade direta do veneno (LORENZI, 2002).

Porém, mesmo conhecendo os venenos de Himenópteros desde o século XIX e sabendo que um grande número de espécies de vespas sociais ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, muito pouco é conhecido e estudado sobre a composição dos venenos destes insetos, especialmente os neotropicais. Devido a isso nosso conhecimento toxinológico é limitado, criando muitas dificuldades para se administrar o cuidado apropriado com as vítimas (PALMA e BRAGA, 1994).

A investigação sobre novos componentes destes venenos, bem como o aprofundamento dos conhecimentos sobre a relação estrutura/função dos componentes já identificados, certamente irá contribuir para expandir nossos conhecimentos sobre a bioquímica, fisiologia e farmacologia dos venenos de Hymenoptera sociais, permitindo um cuidado mais adequado das vítimas ferroadas destes insetos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS CONSTITUINTES DOS VENENOS DE HIMENOPTEROS

Os constituintes dos venenos de Himenópteros têm sido bem documentados para a maioria das vespas sociais endêmicas de clima frio (NAKAJIMA *et al.*, 1986); os mesmos contêm vários tipos de amins biogênicas (<1KDa), peptídeos (1KDa à 10KDa) e proteínas (>10KDa), incluindo algumas hidrolases (como as fosfolipases, proteases, hialuronidases, fosfatases e nucleotidasas) (NAKAJIMA *et al.*, 1986; MENDES *et al.*, 2004b).

2.1.1 Compostos de Alta Massa Molecular

Considerando-se os componentes de alta massa molecular presentes nos venenos de Himenópteros, encontramos enzimas como: colinesterases em *V. orientalis* (EDERY *et al.*, 1978) e em *V. vulgaris* (EDERY *et al.*, 1978); histidina decarboxilase em *Vespa (Dolichovespula) macculata* (EDERY *et al.*, 1978) e em *V. (Paravespula) maculiforme* (EDERY *et al.*, 1978); DNAses em *Vespa orientalis* (EDERY *et al.*, 1978); hialuronidases em *V. (Paravespula) vulgaris* (EDERY *et al.*, 1978), *V. orientalis* (EDERY *et al.*, 1978), *Polistes versicolor* (CASTRO *et al.*, 1994), *Dolichovespula maculata* (LU *et al.*, 1995) e *Polistes gallicus* (PANTERA *et al.*, 2003); proteases em *Polistes omissa* (EDERY *et al.*, 1978), *V. orientalis* (EDERY *et al.*, 1978) e *Polistes gallicus* (PANTERA *et al.*, 2003); poli e dissacarídates em *V. orientalis* (EDERY *et al.*,

1978), fosfolipases *V. (Paravespula) vulgaris* (EDERY *et al*, 1978), *V. cabro* (EDERY *et al*, 1978), *V. orientalis* (EDERY *et al*, 1978), *Vespa basalis* (HO e KO, 1988), *Vespula vulgaris* (KING *et al*, 1996), *Polistes dominulus* (HOFFMAN, 1997), *Polybia paulista* (OLIVEIRA e PALMA, 1998) e *Agelaia pallipes pallipes* (COSTA e PALMA, 2000), entre outras proteínas.

Os principais alérgenos dos venenos de vespas sociais são a fosfolipase A₂ (EDERY *et al*, 1978; OLIVEIRA e PALMA, 1998; HOFFMAN, 2006), a hialuronidase (EDERY *et al*, 1978; CASTRO *et al*, 1994) e o Antígeno 5 (HOFFMAN, 2006).

A fosfolipase A₂ é tida como um dos mais importantes alérgenos em venenos de vespídeos. Catalisando hidrólises específicas de ligações ésteres na posição do C₂ de 1,2-diacil-3-sn-glicerofosfolipídeos formando ácidos graxos livres. Sendo capaz de romper os empacotamentos lipídicos de diferentes membranas biológicas e levando a formação de poros e/ou lise celular (OLIVEIRA e PALMA, 1998). As fosfolipases A, principalmente a do tipo A₂, têm sido detectadas em diferentes organismos e são responsáveis por diversos efeitos miotóxicos e neurotóxicos (COSTA e PALMA, 2000).

A hialuronidase é uma enzima pertencente à família das glicosil hidrolases encontradas nos venenos de abelhas. Ela possui 350 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto e quatro sítios de glicosilação N-ligados. A função dessa enzima é potencializar a infiltração dos venenos pela dissolução da matriz extracelular por meio da clivagem das ligações entre N-acetil-glicosamino e D-ácido glucurônico dos ácidos hialurônicos (HOFFMAN, 2006).

Já o Antígeno 5 é o alérgeno mais estudado dos venenos das vespas. Sua seqüência de aminoácidos já foi descrita para 19 espécies de vespas sociais, sendo que seis delas são do gênero *Vespa*. A seqüência de aminoácidos encontradas para esse composto de alta massa molecular pode variar de 201 a 204 resíduos, podendo também ser encontrado em outros organismos, tais como: leveduras, plantas, helmintos, répteis e mamíferos (HOFFMAN, 2006).

2.1.2 Compostos de Baixa Massa Molecular

Entre as substâncias de baixas massas moleculares dos venenos de vespa, encontramos: acetilcolina em *Vespa cabro* (EDERY *et al*, 1978), *V. orientalis* (EDERY

et al., 1978) e *Vespa cincta* (LAHIRI e SARANGI, 1979); serotonina em *Vespa orientalis* (EDERY *et al.*, 1978) e *V. cabro* (EDERY *et al.*, 1978) e *V. basalis* (Ho e Hwang, 1991); dopamina, noradrenalina e adrenalina em *Vespa vulgaris* (EDERY *et al.*, 1978) e *Vespula (Paravespula) germânica* (EDERY *et al.*, 1978); histamina em *V. orientalis* (BERGMANN *et al.*, 1966), *Polistes* (FINDLAY *et al.*, 1977), *Vespa cabro* (EDERY *et al.*, 1978), *V. vulgaris* (EDERY *et al.*, 1978), *Vespa cincta* (LAHIRI e SARANGI, 1979) e *Agelaia pallipes pallipes* (MENDES *et al.*, 2004a,b).

2.1.3 Compostos Peptídicos

Em geral, os componentes peptídicos desses venenos são classificados em três grupos principais: (1) Cininas, análogas à bradicinina, responsáveis por dores, contração da musculatura lisa e redução da pressão sangüínea (PISANO, 1968; TOKI *et al.*, 1988); (2) Mastoparanos, tetradecapeptídeos hidrofóbicos, degranuladores de mastócitos (HIRAI *et al.*, 1978; TOKI *et al.*, 1988); e (3) Quimiotáticos, tridecapeptídeos hidrofóbicos, com atividade quimiotática para leucócitos polimorfonucleares (TOKI *et al.*, 1988).

2.1.3.1 As Cininas

Atualmente, muitas cininas (grupo 1) de vespas sociais têm sido isoladas e caracterizadas bioquimicamente, apesar de suas propriedades farmacológicas ainda não terem sido completamente investigadas devido às baixas concentrações destes peptídeos na grande maioria dos venenos de vespas sociais. Algumas cininas possuem parte de suas seqüências primárias altamente conservadas em relação às bradicininas, com algumas exceções, onde ocorre uma substituição dos resíduos de aminoácidos das posições três e seis na seqüência da bradicinina (NAKAJIMA, 1986). Outras cininas que são encontradas nos venenos de vespas do gênero *Polistes*, onde o resíduo de serina da posição seis é substituído pela treonina, apresentam uma grande semelhança com a plasmacinina de tartarugas (DUNN e PARKS, 1970). Ainda temos aquelas cininas encontradas no veneno de vespas do gênero *Vespa*, onde ocorre a substituição do resíduo de prolina da posição três por hidroxiprolina, sendo desta forma, um análogo à

bradicinina encontrada na pele do anfíbio *Heleophryne depressa* (NAKAJIMA *et al.*, 1979).

Griesbacher *et al* (1998) encontraram bradicina e Thr⁶-bradicinina nos venenos das vespas sociais *Vespula vulgaris*; *Vespa analis* e *Vespa tropica* (GOBBO *et al.*, 1995). A bradicinina também foi encontrada nos venenos de vespas solitárias *Megacampsomeris prismática* e a Thr⁶-bradicinina em *Campsomeriella annulata annulata* e *Carinoscolia melanosoma fascinata* (KONNO *et al.*, 2002).

E mais recentemente, Mendes e Palma (2006) isolaram, identificaram e seqüenciaram dois novos peptídeos caracterizados como cininas, do veneno da vespa social *Protopolybia exígua*. Foram eles a Protopolybiacinina-I, causadora da constrição de músculos do íleo, de maneira menos potente quando comparada com a bradicinina; indutora da degranulação de mastócitos (sete vezes mais potente que a causada pela bradicinina) e responsável pela dor seguido da ativação direta de receptores B₂; e a Protopolybiacinina-II, com função degranuladora de mastócitos (dez vezes mais potente que a causada pela bradicinina), exercendo pequenos efeitos constritores sobre o músculo íleo.

2.1.3.2 Os Mastoparanos

Os componentes peptídicos mais abundantes e mais estudados nos venenos das vespas são aqueles pertencentes à classe dos mastoparanos (grupo 2), cuja principal atividade biológica é a degranulação de mastócitos, liberando os mediadores presentes em seus grânulos (PIEK, 1986). Trata-se de um peptídeo anfifílico com conformação em hélice- α composto de 10 a 14 resíduos de aminoácidos sem nenhuma cisteína em sua seqüência primária (NAKAJIMA *et al.*, 1986; MENDES *et al.*, 2005). Os mastoparanos também possuem resíduos de lisina em suas cadeias que tem, como possível função, a facilitação da liberação de histamina de mastócitos (Higashima *et al.*, 1990).

No ano de 1979(a), Hirai e colaboradores identificaram e caracterizaram o primeiro mastoparano a partir do veneno da vespa social *Vespula lewisii*. Este peptídeo, composto basicamente de lisina e aminoácidos hidrofóbicos, foi o primeiro exemplo de peptídeo degranulador de mastócitos isolado do veneno de vespas. A seqüência primária

dos mastoparanos assemelha-se muito à da bombinina, um peptídeo hemolítico isolado da pele do sapo *Bombina variegata* (CSORDÁS e MICHL, 1970).

Esses peptídeos policatiônicos estão envolvidos na ocorrência de inflamações, incluindo lise de membranas celulares, degranulação de mastócitos, liberação histamínica e conseqüente vasodilatação; indução de quimiotaxia de neutrófilos e células *T helper*, o que resulta em recrutamento de leucócitos para o local inflamado (HANCOCK e DIAMOND, 2000).

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

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

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

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

Segundo Park *et al.* (1995), os mastoparanos apresentam várias atividades biológicas diferentes, podendo agir como um potente agente promotor de excitação de diversas células de mamíferos, causar a secreção de histamina de mastócitos, mesmo em

baixas concentrações (3×10^{-7} M) (NAKAJIMA, 1986) e de promover a liberação de serotonina à partir de plaquetas e de prolactina a partir da glândula pituitária anterior (HIRAI *et al.*, 1979a; KURODA *et al.*, 1980). Podem ainda, apresentar atividade hemolítica, como é o caso do “mastoparano-X”, do veneno de *Vespa xanthoptera* (em concentração de 4×10^{-6} M) (HIRAI *et al.*, 1979b), e do mastoparano-B, isolado de *Vespa basalis* (HO e HWANG, 1991). O mastoparano-B presente no veneno de *Vespa basalis* participa das atividades hemolítica e de formação de edema, além de provocar falência cardiovascular, devido a uma excessiva liberação de íons potássio eritrocitários, induzida pela toxina (HO *et al.*, 1994).

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

Wakamatsu *et al* (1983) descreveram que, pela análise de dicroísmo circular, a conformação das moléculas de mastoparano-X, como ligantes de vesículas de fosfatidilcolina, é altamente α -helicoidais. Entretanto, a conformação do mastoparano associado às micelas de lisofosfatidilcolina não é exatamente a mesma que da molécula de mastoparano associado à vesículas de fosfatidilcolina. Visto que as atividades biológicas dos peptídeos estão correlacionadas com as conformações de suas moléculas, os autores propõem que é mais importante analisar a conformação dos peptídeos como ligantes da bicamada fosfolipídica, do que das micelas.

Argiolas e Pisano (1983) estudaram a semelhança entre a melitina (encontrada em abelhas) e os mastoparanos (encontrados nas vespas) e chegaram à conclusão de que ambos eram capazes de estimular a fosfolipase A_2 através de mecanismos diferentes. Enquanto a melitina interage com os fosfolipídios de membrana, os mastoparanos estimulam a degranulação de mastócitos, que liberam entre outras substâncias: prostaglandinas e leucotrienos, que por sua vez irão agir com os fosfolipídios de membrana em interação com as fosfolipases. Estes autores relataram em 1984(a), que os

mastoparanos são também potentes ativadores de fosfolipase-A₂ e -C, causando um aumento na produção de ácido araquidônico.

Peptídeos similares, como a crabrolina e os HR-I e HR-II foram isolados de *Vespa crabro* e *Vespa orientalis*, respectivamente (NAKAJIMA *et al.*, 1986). A crabrolina, assim como o mastoparano, é um estimulador da fosfolipase A₂ e causa liberação de histamina de mastócitos peritoniais, porém seu modo de ação difere do modo de ação dos mastoparanos clássicos (ARGIOLAS e PISANO, 1984a).

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

Ainda em um outro trabalho realizado no mesmo ano, Argiolas e Pisano (1984b), também descreveram as bombolitinas (I, II, III, IV e V), como sendo heptadecapeptídeos com aminoácidos hidrofóbicos e cargas positivas em pH neutro, sendo peptídeos aparentemente anfifílicos por possuírem segmentos em α -hélice. Similares aos mastoparanos em sua seqüência primária e, semelhantes funcionalmente à melitina e à crabrolina por facilitar a atividade da fosfolipase A₂.

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

O mastoparano B é liberador de histamina de mastócitos, é um potente agente hemolítico de células vermelhas, ativador da proteína-G, além de agir em sinergia com a “proteína letal” (uma outra proteína do veneno do vespão) (HIGASHIJIMA *et al.*, 1988, PARK *et al.*, 1995, HO *et al.*, 1994, HO *et al.*, 1996). Estudos anteriores sobre a relação entre estrutura e atividade dos mastoparanos revelaram o importante papel dos três primeiros resíduos de aminoácidos no influxo de Ca⁺², na afinidade aos lipossomos ou inibição da sensibilidade à calmodulina e momentos de hidrofobicidade do mastoparano (NAKAJIMA *et al.*, 1986).

Dohtsu *et al.* (1993) isolaram do veneno da vespa *Protonectarina sylveirae*, um peptídeo chamado “silverina” que não apresentou homologia de sua seqüência primária

com nenhuma classe de peptídeo anteriormente caracterizada. Até o presente momento, é o único peptídeo conhecido no veneno de vespas sociais, que apresenta ponte dissulfeto. O fato mais interessante deste peptídeo é que se trata de um potente indutor da liberação de histamina de mastócitos, mas que não causa hemólise e, provavelmente, o seu modo de ação difere daquele dos mastoparanos.

Em seguida, Park e colaboradores (1994) publicaram um estudo sobre a interação do mastoparano-B com as membranas fosfolipídicas. Concluiu-se que a interação do resíduo de Lys² no mastoparano-B e o grupo ácido da cabeça lipídica possui importante papel na estabilização da estrutura em α -hélice. Estudos específicos realizados pelos autores supra citados evidenciaram que o mastoparano-B induz a desestabilização da bicamada lipídica; por meio da interação com a membrana fosfolipídica. Cerca de três ou quatro resíduos de Lisina catiônicos são expostos a uma fase aquosa, enquanto a parte hidrofóbica da molécula penetra profundamente por entre as camadas lipídicas. Isso faz com que as moléculas de peptídeos se acumulem predominantemente na metade exterior da bicamada, causando a desestabilização das cadeias alquílicas nos lipídeos da bicamada em lipossomos neutros, permitindo que os peptídeos penetrem rapidamente por entre a membrana. Por outro lado, em lipossomos ácidos, a interação entre as cargas do peptídeo catiônico com o lipídio aniônico inibe a penetração profunda dos peptídeos para o outro lado da bicamada.

Os experimentos realizados por Park *et al.* (1994) também mostraram que os mastoparanos (MP e MP-B) apresentam alta atividade antibiótica, porém algumas diferenças foram observadas nas especificidades antimicrobianas destas moléculas. Por exemplo, o MP-B apresentou pronunciada atividade antibiótica, tanto contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, quanto para bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *Shigella sonnei*. Já o MP apresentou atividade acentuada apenas contra as bactérias Gram-positivas. Segundo os autores, isto é devido às características anfifílicas das moléculas peptídicas. Park *et al.* (1994) demonstraram ainda, que a introdução de aminoácidos básicos, como lisina, na parte hidrofóbica da molécula promove um aumento na atividade contra bactérias Gram-negativas, acompanhada de uma drástica redução na atividade contra as Gram-positivas. Por outro lado, quando resíduos de lisina são incorporados na porção hidrofílica da seqüência peptídica observa-se uma diminuição no efeito antibacteriano destes peptídeos.

Dois anos mais tarde, Ho *et al* (1996) propuseram que aparentemente a Lys² e o Trp⁹ são os resíduos críticos para a produção da atividade hemolítica dos “mastoparanos-B” e essa única estrutura provavelmente pode ser importante para sua maior atividade hemolítica.

Um outro peptídeo extraído do veneno de vespa solitária é o Anoplin, extraído do veneno de *Anoplius samariensis* (KONNO *et al*, 1998). Trata-se de um peptídeo rico em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, também com seqüência primária similar aos mastoparanos, principalmente a do “mastoparano-X” e crabrolina, que são degranuladores de mastócitos, isolados do veneno de *Vespa xanthoptera* (KRISHNAKUMARI e NAGARAJ, 1997) e *Vespa crabro* (ARGIOLAS e PISANO, 1984a), respectivamente. Também foi constatada a atividade antibiótica do Anoplin contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser considerado de grande importância no processo de preservação das presas desses animais, contra infecções (KONNO *et al.*, 2001).

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

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

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

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

2.1.3.3 Os Peptídeos Quimiotáticos

Os peptídeos quimiotáticos (grupo 3) encontrados nos venenos de vespas são chamados de Ves-CPs ("peptídeos quimiotáticos de vespas"). Todos são tridecapeptídeos, com seqüências primárias semelhantes às dos mastoparanos, apresentando abundância de aminoácidos hidrofóbicos. Com poucas exceções, possuem conformação em hélice anfipática, na qual todos os resíduos hidrofóbicos estão localizados em uma mesma porção da molécula, enquanto que resíduos básicos como arginina e lisina aparecem na porção oposta (NAKAJIMA, 1986).

Os peptídeos que induzem a quimiotaxia de neutrófilos foram inicialmente encontrados nos venenos das espécies *Vespa tropica*, *V. mandarinia*, *V. analis*, *V. cabro*, *V. xanthoptera*, *V. orientalis*, *Paravespula lewisii*, *Icaria sp* (NAGASHIMA *et al.*, 1990).

Foi isolado do veneno de uma pequena vespa da Nova Guiné, *Icaria sp*, um peptídeo que não apresentou elevada atividade de liberação de histamina, o qual foi chamado Icaria-CP (NAKAJIMA, 1986). Esta propriedade do Icaria-CP pode ser devido à baixa ocorrência de resíduos de aminoácidos básicos em sua seqüência

primária. Peptídeos hidrofóbicos como este, são conhecidos por causarem a quimiotaxia de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares em concentrações da ordem de 0,1 mM (NAKAJIMA *et al.*, 1986). Estes componentes quimiotáticos possuem a propriedade de promover alguma degranulação em mastócitos, embora sua seqüência primária se diferencie um pouco da dos mastoparanos.

Toki *et al.* (1988) isolaram o peptídeo quimiotático “Peptídeo 43” do veneno da vespa *Parapolybia indica*, composto de treze resíduos de aminoácidos, rico em aminoácidos hidrofóbicos como leucina ou isoleucina, com um único resíduo de lisina na 6ª posição, e se diferencia dos demais peptídeos quimiotáticos usuais que se iniciam com a seqüência F-L-P e terminam com I-L-NH₂ ou L-L-NH₂. Essa seqüência primária com poucas cargas positivas na seqüência peptídica contrasta com aquela já conhecida para a liberação de histamina de mastócitos (NAGASHIMA *et al.*, 1990).

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

Mendes *et al.* (2004b) descreveram que o peptídeo Protonectina, previamente observado no veneno da vespa *Protonectarina sylverae* por Dohtsu *et al.* (1993), também foi encontrado no veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*. Esse peptídeo apresentou atividade hemolítica, degranuladora de mastócitos peritoniais de ratos e quimiotática para leucócitos polimorfonucleares (MENDES *et al.*, 2004a,b).

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

Já no ano de 2006, Xu *et al.* descreveram estruturalmente três novos peptídeos quimiotáticos do veneno da *Vespa magnifica* denominados 5e (que possui estrutura idêntica ao VESCP-X, encontrado anteriormente no veneno da *Vespa xanthoptera*), 5f e 5g. Todos os três peptídeos quimiotáticos apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica potente.

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

2.2 INTERAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS E MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Os seres vivos em geral, incluindo os animais, produzem compostos para se protegerem contra microorganismos, sendo que muitas dessas moléculas são peptídeos. Com o aumento dos problemas causados pela resistência de organismos patogênicos aos antibióticos convencionais, aumentou-se o interesse pela aplicação farmacológica de peptídeos antibióticos para o tratamento de infecções. Visando essa nova linha de estudos, tentativas estão sendo feitas no intuito de aumentar a potência e a especificidade desses peptídeos, de uma forma que sejam tóxicos a microorganismos e não a mamíferos. Por esse motivo, é importante conhecer os mecanismos de ação desses agentes e a razão para sua seletividade contra os agentes infecciosos (EPAND e VOGEL, 1999).

Durante a última década, um grande número de peptídeos antimicrobianos têm sido descobertos a partir de animais e de plantas. Essas moléculas são reconhecidas como componentes importantes dos mecanismos de defesa inata e estão presentes nas superfícies mucosas, na superfície do corpo e dentro dos grânulos dos fagócitos (REDDY *et al.*, 2004; MATSUZAKI, 1999). Esses peptídeos são tipicamente compostos de 12-45 resíduos de aminoácidos. Em geral, esses peptídeos possuem toxicidade seletiva (esses peptídeos devem discriminar entre células próprias do organismo e células microbianas); são capazes de matar rapidamente as colônias de bactérias; possuem um amplo espectro antimicrobiano (uma simples espécie de peptídeo pode ser efetivo contra vários tipos de microorganismos) e não desenvolvem resistência (esse peptídeo deve ter um mecanismo de ação contra o qual uma bactéria dificilmente desenvolveria resistência) (MATSUZAKI, 1999).

Por serem altamente básicos (catiônicos), devido a presença de múltiplos resíduos de Lys e Arg, eles formam estruturas secundárias anfipáticas, que se acomodam por entre a membrana (MATSUZAKI, 1999).

A estrutura anfifílica tem sido encontrada em várias moléculas peptídicas biologicamente ativas. Em particular, esta estrutura apresenta-se em conformação de hélice-a, sendo considerada como sendo a unidade estrutural mais importante para a atividade antibiótica de muitos peptídeos, ocorrendo naturalmente em peptídeos como a melitina (HABERMANN, 1972), cecropina (REES *et al.*, 1997), magainina (ZASLOFF, 1987), dermaceptina (MOR *et al.*, 1991; MOR e NICOLAS, 1994), apidaecinas e drosocinas (OTVOS JR *et al.*, 2000). Essa estrutura anfifílica também é encontrada com frequência em peptídeos produzidos por fungos, insetos, anfíbios e mamíferos, com atividade antibiótica, antifúngica, antiviral, hemolítica e antitumoral (LORENZI, 2002).

Sabe-se que a natureza policatiônica e hidrofóbica dos peptídeos é importante para a interação inicial entre os mesmos e a membrana plasmática das bactérias (HANCOCK *et al.*, 1995; WU e HANCOCK, 1999). Esta característica policatiônica da molécula e a conformação em hélice promovem um aumento na afinidade dos peptídeos pela membrana citoplasmática de bactérias (WIEPRECHT *et al.*, 1997).

Segundo Hancock e Chapple (1999), a natureza anfifílica e catiônica desses peptídeos é fundamental para a interação inicial entre o peptídeo e as membranas de bactérias, principalmente daquelas Gram-negativas. Os sítios positivos do peptídeo interagem com cargas negativas da membrana externa e citoplasmática (WU e HANCOCK, 1999), podendo, assim, causar distúrbios de permeabilidade nestas células (HANCOCK e CHAPPLE, 1999).

E, tanto nos vertebrados como nos invertebrados existem mecanismos de defesa exclusivos ou complementares ao sistema imune (SHAI, 1999), que incluem polipeptídios sintetizados em resposta a um estímulo específico e que são capazes de agir contra um determinado agente infeccioso. Pouco se conhece sobre as bases moleculares da especificidade desses peptídeos policatiônicos antimicrobianos com relação às membranas bacterianas. Sugere-se que a permeabilidade da parede bacteriana seja causada pela destruição do gradiente de energia existente na membrana (SHAI, 1995).

A classificação de peptídeos antimicrobianos é de alguma maneira arbitrária e existem análogos com seqüências similares e diferentes motivos conformacionais (EPAND e VOGEL, 1999), os quais podem ser divididos em diferentes classes, apesar da similaridade de suas estruturas químicas e possibilidade de seus mecanismos de ação (BULET *et al.*, 1999).

Ainda segundo esses autores, devido à grande variedade de peptídeos antibióticos, foi necessária a divisão em grupos: (1) peptídeos lineares que formam hélices anfipáticas e hidrofóbicas; (2) peptídeos cíclicos e pequenas proteínas que formam folhas- β ; (3) peptídeos com uma única composição de aminoácidos; (4) peptídeos cíclicos com grupos tio-eter no anel; (5) lipopeptídeos terminados em amino álcoois e (6) peptídeos macrocíclicos atados, baseados na estrutura dessas moléculas.

Em geral, os mecanismos de ação desses grupos não estão bem estabelecidos. Para muitos existem evidências de que um dos alvos são as membranas lipídicas. Isso ocorre porque os peptídeos podem freqüentemente aumentar a razão de escape dos conteúdos aquosos internos dos lipossomos. Além disso, a maioria dos peptídeos antibióticos é catiônica e suas interações com fosfolipídios aniônicos podem fornecer uma explicação para sua especificidade às membranas bacterianas. Em bactérias Gram negativas, ambos os lados da membrana plasmática possuem moléculas aniônicas orientadas para o exterior da célula, o que não é o caso das células dos mamíferos (EPAND e VOGEL, 1999).

Os peptídeos antimicrobianos catiônicos preferencialmente ligam-se às cargas negativas expostas das membranas bacterianas, mas não à superfície externa zwitteriônica das membranas dos eucariontes. Recentemente questionou-se a existência de correlação entre a habilidade de penetrar nas membranas e atividades antimicrobianas. É possível que os efeitos nas membranas estejam diretamente relacionados com a maneira pela qual eles penetram na célula para alcançar um alvo alternativo. Em relação ao mecanismo pelo qual o peptídeo “rompe” a barreira permeável da membrana, é possível que o peptídeo induza a completa lise da célula, pela ruptura da membrana ou, que ele perturbe a bicamada lipídica, permitindo a ligação de certos componentes celulares bem como dissipando o potencial elétrico da membrana (EPAND e VOGEL, 1999).

Peptídeos que não são policatiônicos exibem menor seletividade para células microbianas quando comparadas com células de mamíferos. Como por exemplo, a alameticina, um peptídeo citotóxico hidrofóbico, carregado negativamente que forma grupos de hélices que atravessam a bicamada, formando um poro aquoso que transporta íons. Um outro exemplo é a magainina, um peptídeo catiônico, antimicrobiano, com hélices anfipáticas, isolado da pele do sapo *Xenopus laevis* (EPAND e VOGEL, 1999).

As membranas biológicas contêm uma grande variedade de lipídeos. Uma propriedade dessas membranas têm sido associada à especificidade antimicrobiana de suas cargas negativas. Vários peptídeos antibióticos são catiônicos e preferencialmente se ligam a lipídios aniônicos. Isso fornece um mecanismo potencial para especificidade antimicrobiana, já que a maioria dos lipídios aniônicos das membranas celulares dos mamíferos é seqüestrada para o lado citoplasmático da célula, enquanto que esses mesmos lipídeos ficam expostos do lado externo das bactérias. É possível que a interação dos peptídeos catiônicos com as membranas cause preferencialmente o seqüestro de lipídios aniônicos, originando fronteiras menos regularmente empacotadas entre os domínios ricos em lipídios aniônicos e o restante da membrana (EPAND e VOGEL, 1999).

De acordo com Shai (1995), as interações entre peptídeos-membranas e proteínas-membranas são essenciais para inúmeros eventos biológicos como a transdução de sinais, síntese de ATP, contração muscular e infecção viral, entre outros processos. As hélices-a anfipáticas são estruturas comuns encontradas em um grande número de proteínas de membranas. Essas estruturas são formadas se a hidrofobicidade de seus vários resíduos apresentarem uma periodicidade entre 3 e 4 resíduos aminoácidos polares arranjados ao longo de um lado, e os aminoácidos hidrofóbicos do outro lado .

Essas estruturas têm sido bastante estudadas e é provável que elas sejam importantes para várias funções como a solubilização de lipídios, lise de células bacterianas, ligação eficiente de hormônios e seus receptores e escolha de proteínas nas mitocôndrias. Muitos polipeptídios anfipáticos diferem em suas atividades. Alguns são altamente citolíticos, hemolíticos e antibacterianos com ação sobre os fosfolipídios, enquanto outros têm somente algumas dessas funções (SHAI, 1995).

Muitos polipeptídios anfipáticos formam canais e/ou poros na membrana pelo mecanismo “barril”, que envolve três passos principais: (1) ligação dos monômeros na membrana, (2) inserção na membrana para a formação do poro e (3) recrutamento progressivo de monômeros adicionais para aumentar o poro (BECHINGER *et al.*, 1999; SHAI, 1999).

A região acil dos lipídios de membrana, que possui uma baixa constante dielétrica, não pode formar pontes de hidrogênio e nem podem ter contato direto com a superfície polar de uma única hélice- α anfipática. Porém os polipeptídios podem se ligar às membranas através de diferentes mecanismos: alguns peptídeos anfipáticos ligam-se somente à superfície da membrana, podendo destruir a estrutura da membrana sem atravessá-la; outros peptídeos anfipáticos podem atravessar a bicamada lipídica interagindo especificamente com outras moléculas peptídicas; e ainda existem os peptídeos anfipáticos que formam agregados de maneira seletiva e formam poros (permeáveis à água) de tamanhos variáveis que permitem o extravasamento de íons e outros solutos citoplasmáticos (SHAI, 1995; SHAI, 1999).

Pequenas alterações na seqüência peptídica dessas moléculas podem alterar grandemente suas propriedades. Por exemplo, a Pardaxina (neurotoxina excitatória), é um polipeptídio de 33 resíduos de aminoácidos, isolado da *Pardachirus marmoratus* e *P. pavoninus*, e, dependendo de sua concentração possui uma função diferente. Em concentrações baixas, induz a liberação de neurotransmissores dependentes de cálcio, enquanto que em altas concentrações, induz a citólise. Este peptídeo também está relacionado à interferência no transporte iônico do sistema osmoregulatório do epitélio e da atividade pré-sináptica (SHAI, 1995). Ainda segundo esse mesmo autor, apesar de ser solúvel em água, a Pardaxina é capaz de se incorporar espontaneamente entre os fosfolipídios de membrana, formando canais iônicos dependentes de voltagem com ação seletiva aos cátions. Ela se liga fortemente e penetra por entre cargas negativas dos fosfolipídios zwitteriônicos. Essa associação forte com os fosfolipídios zwitteriônicos pode explicar o efeito lítico nas células eucarióticas que expressam predominantemente fosfolipídios de fosfatidilcolina na superfície externa da membrana (SHAI, 1995).

Vários estudos sugerem um eficiente modo de ação geral, o mecanismo do “carpete” que está sendo demonstrado como característico para muitos peptídeos nativos não hemolíticos e desenvolvidos “de novo”. Baseado nesse mecanismo, uma

nova família de peptídeos antibacterianos diastoméricos foi desenvolvida. As propriedades únicas dessa família de drogas a tornam promissora para o tratamento de doenças infecciosas (SHAI, 2002).

Por exemplo, a cecropina (isolado de inseto) e a magainina (isolado da pele do *Xenopus laevis*), compostos somente de D-aminoácidos, possuem atividades antibacterianas. Devido à sua estrutura anfipática, sugere-se que (1) os peptídeos liguem-se paralelamente à superfície da membrana cobrindo-a, sem penetrar profundamente no centro hidrofóbico; (2) essa associação só ocorre quando a concentração mínima é atingida e (3) forças eletrostáticas são cruciais para a ligação desses peptídeos nas membranas (SHAI, 1995; MATSUZAKI, 1999).

Além disso, a ativação dos mastócitos teciduais (seja pela interação com receptores da membrana das células, seja através da interação com os fosfolipídios da membrana das células) pode contribuir de forma importante para os danos teciduais locais e distribuição sistêmica dos componentes dos venenos. Essa hipótese é consistente com o papel bem entendido dos mastócitos na patologia das desordens alérgicas, como a anafilaxia e asma.

Por outro aspecto, recentemente foi proposto um novo papel para os mastócitos, no sentido de atuar na defesa celular contra a presença de toxinas no organismo. Neste sentido, as proteases presentes nos grânulos dos mastócitos teriam papéis benéficos, atuando na degradação das proteínas tóxicas, presentes nos venenos de uma maneira geral (METZ *et al.*, 2006a,b).

Rosenfeld e colaboradores (2006) demonstraram que as combinações de peptídeos entre si podem aumentar o espectro da atividade antibacteriana pela indução de mudanças nas propriedades biofísicas desses peptídeos, quando ligados aos lipopolissacarídeos (LPS). Esses resultados estimulariam estudos adicionais para o melhor entendimento desse novo mecanismo molecular do sinergismo entre os peptídeos antimicrobianos (AMP's) homólogos da mesma espécie e do sinergismo existente entre os peptídeos de outras famílias. Este estudo contribuiria para o desenvolvimento futuro de estratégias terapêuticas baseadas em peptídeos antimicrobianos mais efetivos que as drogas atuais comuns.

Além disso, alguns desses peptídeos também seriam capazes de interagir com as membranas biológicas através da interação com receptores de membrana, direta ou

indiretamente acoplados à Proteínas G, promovendo a ativação celular. Um exemplo seria o caso dos peptídeos Protopolybiacinina I e Protopolybicianina II, isolados do veneno da vespa social *Protopolybia exigua*. As seqüências primárias desses peptídeos assemelham-se à da bradicinina (BK), que tem como característica, estimular receptores B₁ e/ou B₂ específicos. Em altas concentrações, a Polybiacianina I causa contração muscular do íleo, provavelmente devido à possibilidade deste peptídeo ser um agonista parcial do receptor do tipo-B₂, que pertence à classe dos receptores de sete hélices transmembranares, acoplados a proteínas G (MENDES e PALMA, 2006).

Evidencias sugerem que a molécula de BK é flexível e está em equilíbrio entre as múltiplas conformações em solução aquosa. Evidencias experimentais sugerem que os 4 últimos resíduos carboxiterminais apresentam uma conformação de volta-B (Ser-6 e Arg-9) em meio hidrofóbico, importante para a ligação ao seu receptor natural. Através do uso da combinação de modelagem por homologia, dinâmica molecular e simulações de “docking”, foi proposto que a molécula BK assume uma forma em “S” retorcida quando à volta B do C-terminal esta enterrada no receptor enquanto o N-terminal interage com alguns resíduos carregados negativamente do “loop” 3 extracelular, do sítio de ligação do receptor B₂ para uma interação ótima e para causar potentes contrações da musculatura lisa (MENDES e PALMA, 2006).

Devido ao fato das Protopolybiacinas serem moléculas maiores com uma longa estrutura primária, elas podem não se ligar adequadamente ao receptor B₂ para causar uma contração potente da musculatura lisa. Essas considerações podem explicar as diferenças de potência entre BK e as Protopolybiacinas no efeito da contração muscular lisa (MENDES e PALMA, 2006).

Nesse contexto, a busca na natureza por peptídeos antimicrobianos nativos e o desenvolvimento de seus análogos incluem provavelmente mais de 10000 moléculas em estudo. Entretanto, a maioria delas não foi estudada em detalhes. Os estudos iniciais se baseiam na seqüência específica, no comprimento, na incorporação de um D-aminoácido e na estrutura linear, aspectos necessários para retratar a atividade antibacteriana de um polipeptídeo. Algumas vezes, as modificações estruturais existentes nos peptídeos de células de mamíferos e de bactérias, são utilizadas como parâmetros no estudo dos mecanismos de ação de um possível composto para fins terapêuticos (SHAI, 2002).

Apesar dos tantos benefícios teóricos apontados por estudos com os peptídeos antimicrobianos, vários problemas estão associados com essa descoberta: (i) pouca informação disponível sobre a toxicidade *in vitro* e *in vivo* causados por esses peptídeos (e que é dependente de mais estudos relacionados); (ii) pouco conhecimento sobre a estabilidade da interação entre os peptídeos testados e as membranas *in vivo* (que pode ser solucionado combinando-se peptídeos antibióticos com inibidores de proteases ou modificando-se a seqüência dos aminoácidos da cadeia peptídica); (iii) o alto custo da produção em larga escala (minimizado pelo avanço das tecnologias de síntese recombinante) (REDDY *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS

Atualmente, em nosso laboratório, muitos avanços foram obtidos, relacionados aos venenos de vespas sociais neotropicais. O presente trabalho se concentrou na caracterização bioquímica estrutural de dois componentes peptídicos isolados do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, que interagem entre si, sob o ponto de vista molecular e funcional: a Protonectina e a Protonectina (1-6).

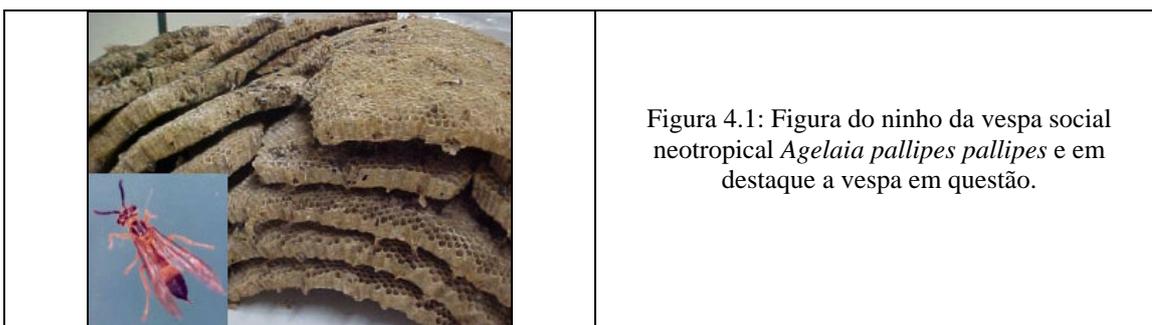
Este trabalho teve por objetivos identificar e caracterizar as estruturas secundárias destes peptídeos isoladamente, bem como da estrutura supra-molecular resultante da interação entre ambos, e ainda verificar os efeitos biológicos desta interação.

Para isto, tais peptídeos foram purificados à partir dos venenos brutos, tiveram suas seqüências primárias confirmadas, e foram sintetizados manualmente em fase sólida, purificados e submetidos a ensaios específicos, para estudos de estrutura secundária por técnicas de dicroísmo circular e também a ensaios de atividades biológicas, tais como: hemólise, degranulação de mastócitos e quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Os ninhos da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* (Figura 4.1) (Hymenoptera, Vespidae) foram coletados na região de Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil. Com o auxílio de pinças microcirúrgicas, retirou-se os reservatórios de veneno das vespas que foram extraídos em MeCN 50% (v/v), a fim de extrair preferencialmente os peptídeos, eliminando restos celulares e outros detritos que poderiam agir como contaminantes.



4.2 Extração e Liofilização do veneno



Figura 4.2: Materiais e equipamentos do laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Centro de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro, utilizados para a extração e liofilização do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*.

Os reservatórios de veneno foram extraídos com auxílio de pinças. Estes reservatórios foram comprimidos com auxílio de um bastão de ponta arredondada na presença de solução de Acetonitrila (MeCN) (grau HPLC – adquirida da Mallinkrodt) 50% (v/v) em água ultrapura e, em seguida, o material solubilizado foi centrifugado à 8000rpm por 15 minutos à temperatura ambiente, em micro centrífuga (Centrífuga Eppendorf - Centrifuge 5415D) de alta rotação. O sobrenadante foi coletado, congelado em freezer à -80°C e liofilizado (Liofilizador a vácuo da marca HETO - Drywinner 3) (Figura 4.2).

4.3 Cromatografia Sob Alta Performance de Fase Reversa

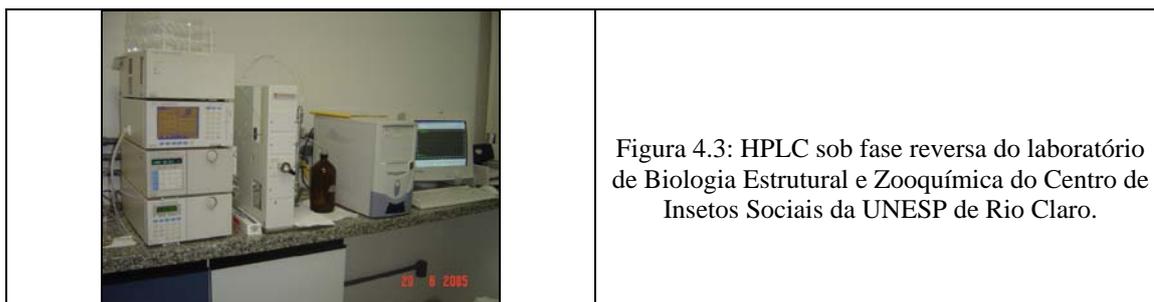


Figura 4.3: HPLC sob fase reversa do laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Centro de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro.

Após solubilização do extrato de veneno liofilizado em MeCN 50% (v/v), o mesmo foi fracionado em HPLC sob fase reversa (HPLC SHIMADZU - Modelo LC-AD 10, com coluna NUCLEOSIL C-18 (250 x 10 mm, 5 μm) (Figura 4.3), de acordo com gradiente descrito na tabela 1; a eluição foi monitorada em por medidas de absorbância em 214nm a um fluxo de 2mL/min.

TABELA 4.1: Gradiente dos Solventes A e B utilizado para o fracionamento do veneno bruto de *Agelais pallipes pallipes* em HPLC.

TEMPO (min)	SOLVENTE A	SOLVENTE B
0,01	95%	5%
5,00	95%	5%
40,00	40%	60%
50,00	40%	60%
50,01	95%	5%
60,00	95%	5%

A = 0,1% (v/v) TFA em água bidestilada

B = 0,1% TFA em Acetonitrila

Para a re-cromatografia de cada uma das frações de interesse, utilizou-se do mesmo sistema de HPLC SHIMADZU (Figura 4.3) - Modelo LC-AD10, com coluna NUCLEOSIL C-18 (250 x 10 mm), sob eluição em condições isocráticas com MeCN 12% e 48% (v/v), contendo de TFA 0,1% (v/v), a um fluxo de 2mL/min.; a eluição foi monitorada por medidas de absorbância em 214nm.

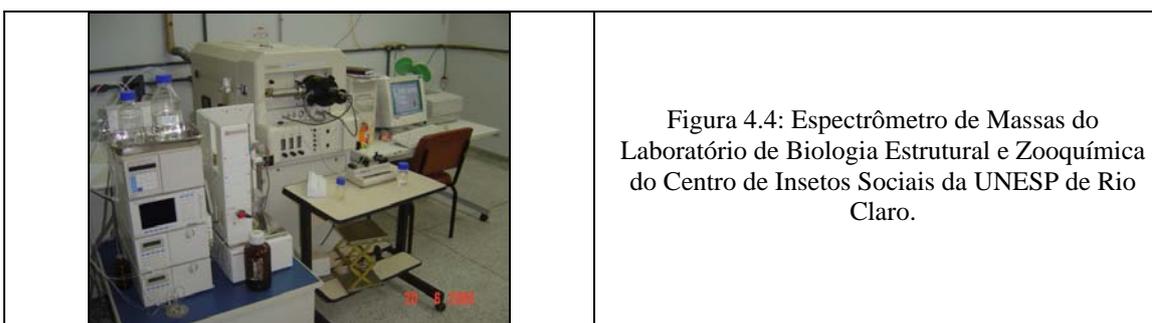
4.4 Espectrometria de massas

Das frações obtidas no re-fracionamento descrito no item 4.3 foi feito o controle de qualidade. Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados num Espectrômetro de Massas ESI – triploquadrupolo, marca MICROMASS, modelo QUATTRO II (Figura 4.4), que permite a realização de fragmentações sucessivas obtendo-se assim, tanto espectros MS quanto MS/MS. Os protocolos de espectrometria de massas foram adaptados a partir do sistema descrito por Chassigne & Lobinski (1998). O espectrômetro de massas triploquadrupolo foi equipado com um probe padrão do tipo electrospray (ESI) (MICROMASS, ALTRINCHAN).

As amostras foram injetadas a um fluxo de 4 µL/min, com auxílio de micro-seringas acopladas a uma microbomba de infusão (KD SCIENTIFIC). Durante todos os experimentos, a temperatura da fonte foi mantida a 80 °C e a voltagem na agulha a 3,6 KV, aplicando-se um fluxo de gás secante (nitrogênio) de 200 l/h e um fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 15 l/h, adquirido direto de um gerador de nitrogênio modelo NITROX N2 UHPLCMS 18 (DOMINICK HUNTER), acoplado ao espectrômetro.

O espectrômetro foi calibrado com mioglobina (de coração de cavalo), a uma voltagem do cone de amostra típica para indução de fragmentos. A massa molecular de cada peptídeo foi determinada por ESI-MS com o espectrômetro ajustado para formar picos, com largura à meia-altura, de uma unidade de massa. A voltagem entre o *skimmer* e o cone de amostra, que controla a transferência dos íons ao analisador de massas, foi ajustada para 30 V.

Cerca de 30 pmol (10 μ L) de cada amostra foi injetada no probe do tipo *electrospray*, transportados pelo solvente. Nos experimentos de MS no modo positivo, o solvente utilizado foi acetonitrila 50% (v/v) acrescido de 0,1% de ácido fórmico (v/v); o espectro ESI foi obtido no modo de aquisição contínua, varrendo num intervalo de massas de m/z 100 a 2500, com tempo de varredura de 7 segundos.



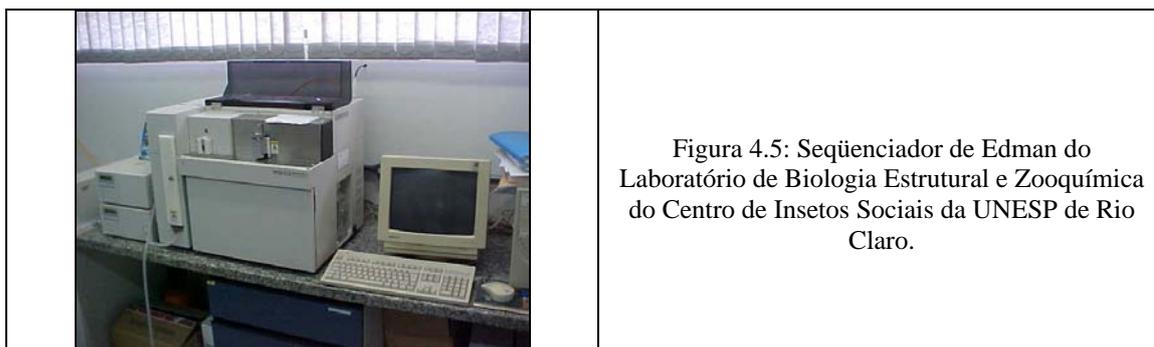
4.5 Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman

Os peptídeos sintetizados e extensivamente purificados que apresentaram um único pico de massa molecular (m/z), em análises de espectrometria de massas, foram submetidos ao seqüenciamento primário através da técnica de Química Degradativa de Edman.

Estes experimentos foram realizados em um seqüenciador automático de fase gasosa PPSQ-21A (SHIMADZU) (Figura 4.5), onde os resíduos de aminoácidos ácidos foram identificados na forma de PTH-aminoácidos ácidos formados a partir de uma seqüência de reações químicas.

A reação de degradação de Edman ocorre no lado N-terminal da cadeia peptídica liberando um resíduo por ciclo reativo. Os resíduos (PTH-aminoácidos) foram identificados através de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho

(HPLC) calibrado com padrões de PTH-aminoácidos (WAKO CHEM.), equipado com uma bomba modelo LC-10AS (SHIMADZU) e um detector de luz ultravioleta modelo SPD-10A, acoplados ao próprio seqüenciador. O controle do sistema e aquisição dos dados foi realizado através do software PPSQ-20 Data Processing e CLASS LC-10A.



4.6 Síntese manual de peptídeos em fase sólida

A síntese dos peptídeos lineares foi realizada através do método manual em fase sólida, utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxicarbonil (estratégia Fmoc). Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo HOBt (NOVABIOCHEM) como agente ativador dos aminoácidos e PyBOP (ALDRICH) como agente acoplante.

Para as lavagens da resina e desproteção foi utilizado N-N-Dimetilformamida (SYNTH) e Piperidina (FLUKA), respectivamente. Todas as reações acima foram realizadas sob agitação mecânica em capela. 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 o peptídeo e a 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).

Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-peptídeo foi centrifugada em uma centrífuga refrigerada (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH) para promover a precipitação do peptídeo. O peptídeo foi ressuscitado em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada (purificador NANOpure BARNSTEAD, modelo D4754).

O controle de qualidade foi feito em espectrômetro de massas ESI-MS e sequenciamento por Química Degradativa de Edman em um sequenciador automático (SHIMADZU, modelo PPSQ-21A).

4.7 Atividade hemolítica

Os experimentos de atividade hemolítica foram realizados segundo modificações da metodologia descrita por Mendes *et al.* (2004a). As concentrações testadas para os peptídeos variaram de 10^{-6} M a 10^{-3} M, sendo que as proporções molares entre ambas as concentrações estão apresentadas na TABELA 2:

TABELA 4.2: Determinação das proporções molares que foram utilizadas para os ensaios das atividades biológicas.

Peptídeo	Proporção
Protonectina	1:0
Protonectina (1-6)	0:1
Protonectina / Protonectina (1-6)	1:1
Protonectina / Protonectina (1-6)	1:2
Protonectina / Protonectina (1-6)	1:4

Foram adicionados cerca de 500 μ L 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 (~280 μ L). Em seguida, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 1% diluindo-se a suspensão concentrada descrita acima, com solução salina isotônica. Essa suspensão de células a 0,5% foi utilizada nos testes de atividade hemolítica.

Foram montadas baterias de ensaios em microplacas (COSTAR), onde cada orifício foi preenchido com os diferentes peptídeos, solubilizados em solução salina: no primeiro pocinho de cada linha correspondentes à toxina/mistura das toxinas foi colocado 90 μ L de solução salina. Nos demais pocinhos, colocou-se apenas 50 μ L de

solução salina. Em seguida, acrescentou-se 10µL da solução de peptídeo(s) nas diferentes concentrações e proporções em cada primeiro pocinho e promoveu-se diluições nos demais pocinhos referentes a cada linha. Após esse procedimento, acrescentou-se 50µL de suspensão de eritrócitos em cada pocinho, perfazendo um volume final de 100 µL.

Para o controle de 0% de hemólise, misturou-se 50 µL de solução salina e 50 µL de suspensão de eritrócitos. Para o controle de 100% de hemólise, misturou-se 40 µL de solução salina, 10 µL de 1% (v/v) de Triton X-100 (SIGMA) e 50 µL de suspensão de eritrócitos.

A microplaca foi incubada à temperatura ambiente (~26°C) por 2 horas sob agitação. Após o período de incubação, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 3000rpm em uma centrífuga Compacta Avanti 30 (BECKMAN). O sobrenadante de cada preparação foi utilizado para a montagem de uma nova placa, para realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (AMERSHAM BIOSCIENCE, modelo Biotrak II), com filtro de 540 nm.

4.8 Atividade Degranuladora de Mastócitos

A degranulação de mastócitos foi determinada através de medidas da liberação de β-D-glucosaminidase (que se co-localiza com a histamina) a partir dos grânulos, segundo metodologia descrita por Hide et al. (1993), com algumas modificações. As concentrações testadas para os dois peptídeos de interesse são as mesmas realizadas nos ensaios de atividade hemolítica (10^{-6} M a 10^{-3} M) segundo as proporções mostradas na Tabela 4.2. Para a realização dos ensaios de degranulação de mastócitos, foi necessária a preparação das soluções:

Solução MCM-1 (Mast Cell Medium): 150 mM NaCl (MERCK), 4 mM KCl (MERCK), 4 mM NaH₂PO₄ (SYNTH), 3 mM KH₂PO₄ (SYNTH), 5 mM glicose (SYNTH), 15 µM BSA (SIGMA) e 1 mM CaCl₂ (VETEC).

Solução MCM-2: 100 mL de solução MCM-1 e 50 µL de Liquevine (heparina sódica 5000 UI/0,25 mL ROCHE).

Solução SH: 0,2 M de citrato (MERCK), com pH 4.5 e 0,0034 g de p-nitrofenil-β-D-glicosamina (SIGMA).

Os ratos Wistar foram anestesiados com éter e, em seguida, decapitados para a retirada do sangue. A cavidade peritoneal foi exposta por meio de um corte longitudinal que permitiu o afastamento dos órgãos para a lavagem da cavidade com 20 mL de solução MCM-2, para a extração do fluido contendo os mastócitos em suspensão. O líquido peritoneal foi coletado com auxílio de uma seringa e, armazenado em banho de gelo. Repetiu-se esse procedimento três vezes. O líquido peritoneal foi centrifugado a velocidade de 100.g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Um volume de 2 mL da solução MCM-1 foi utilizado na ressuspensão do sedimento de células, seguida por centrifugação respeitando as mesmas condições anteriores. Descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se em 2 mL de MCM-1. Essa suspensão de células foi utilizada nos experimentos de degranulação de mastócitos. Realizou-se a contagem de células em Câmara de Neübauer com auxílio de uma solução corante 0,05% (v/v) de cristal violeta em HCl (3,6 M).

Ajustou-se a concentração para $4,5 \times 10^5$ células/mL. A microplaca (COSTAR) foi preparada de maneira semelhante à do ensaio anterior. No primeiro pocinho de cada linha correspondentes à toxina/mistura das toxinas foi colocado 90 uL de MCM-1. Nos demais pocinhos, colocou-se apenas 50 µL de MCM-1. Em seguida, acrescentou-se 10uL da toxina nas diferentes proporções em cada primeiro pocinho e promoveu-se diluições nos demais pocinhos referentes a cada linha. Após esse procedimento, acrescentou-se 50 µL de suspensão de mastócitos em cada pocinho, perfazendo um volume final de 100 µL. Para o controle de 0% de degranulação, misturou-se 50µL de MCM-1 e 50uL de suspensão de mastócitos. Para o controle de 100% de degranulação, misturou-se 50µL de MCM-1 e 50µL de suspensão de mastócitos que foi sonificado por 15 minutos em sonificador (BRANSON 1210).

Incubou-se a microplaca por 15 minutos em banho Maria a 37°C para o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Em seguida, centrifugou-se o conteúdo de cada orifício a 1000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado na seqüência das análises.

Os sobrenadantes resultantes desta última centrifugação foram utilizados para a montagem de uma nova placa, na qual cada orifício continha 50µL deste sobrenadante e 50 µL de Solução SH. Esta nova placa foi incubada por 6 horas a 37°C.

Passado esse período, descartou-se 50 μL de cada orifício e acrescentou-se 150 μL de solução Tris 0,2 M (SIGMA) a cada um deles. A degranulação foi medida através da leitura de absorbância a 405 nm em uma leitora de placas (AMERSHAM BIOSCIENCE, modelo Biotrak II).

Os resultados foram expressos em função da relação entre as proporções das concentrações molares de cada peptídeo e a porcentagem de degranulação.

4.9 Medida da Atividade da Lactato Desidrogenase Liberada de Mastócitos (LDH)

Essa metodologia mede a liberação da Lactato Desidrogenase do citoplasma dos mastócitos de ratos, para meio circundante, como indicador de lise de mastócitos pela toxina peptídica. A LDH catalisa a redução reversível do piruvato a lactato com NADH como coenzima.

A atividade da LDH foi ensaiada com os sobrenadantes de mastócitos peritoniais, incubados com as toxinas peptídicas usadas também para os ensaios de degranulação de mastócitos. Para a determinação da atividade da LDH, utilizou-se o Kit de Ensaios UV-LDH.

Incubou-se 20 μL de sobrenadantes de mastócitos peritoniais com 800 μL de Tampão (Tris 50 mM pH 7,4, contendo Ácido Piruvico 1,2 mM e EDTA 5 mM), durante 5 min. à 25 °C.

O ensaio espectrométrico padrão foi feito medindo-se o decréscimo da absorbância a 340nm, que ocorre devido ao consumo de NADH durante a reação, que foi iniciada pela adição de 200 μL de substrato (NADH 0.15 mM).

Monitorou-se a cinética de consumo de NADH pela medida do decréscimo da absorbância a 340 nm (ΔA_{340}), durante 12 min. a 25 °C. Os resultados foram inicialmente calculados como unidades catalíticas (micromoles de NADH consumidos por min. à 25 °C, pH 7.4).

Converteu-se estes valores em atividade relativa, através do uso da atividade LDH total de mastócitos de ratos lisados, na presença de Triton-X-100 0,1% (v/v) (considerando como referencia de 100%). Os resultados serão expressos como sendo a média +/-S.D. de cinco experimentos.

4.10 Atividade Quimiotática

Os leucócitos foram isolados a partir da indução de inflamação subcutânea em fêmeas adultas de ratos Wistar. A inflamação foi induzida através de uma micro cirurgia, introduzindo-se pedaços de esponja plástica (1 cm³) esterilizadas, na região subcutânea do dorso dos ratos.

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

A contagem dos leucócitos foi feita em câmara de Neübauer em concentração ajustada para $\sim 2,1 \times 10^5$ células / ensaio, para determinação da relação dose/efeito para quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares.

Os resultados foram expressos em número de células/mL, que migraram da parte inferior da câmara dos ensaios, nas diferentes concentrações de cada peptídeo (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M).

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

Foi colocada uma membrana de policarbonato contendo poros de 10 μ m de diâmetro (Neuro Probe, USA), entre a parte inferior e a parte superior da câmara. Cada orifício da parte superior foi preenchido com 200 μ L da suspensão de leucócitos preparada anteriormente.

A câmara foi incubada por 1 hora a 37°C. Foi feita a contagem das células utilizando-se a câmara de Neübauer, sendo que as células foram coradas com solução 0,05% (m/v) de cristal violeta em HCl (3,6N) para facilitar a contagem. Os resultados foram expressos na forma do número de células que migraram de um compartimento para outro da câmara de neuroprovas, em função da concentração molar de cada peptídeo e das proporções entre as mesmas.

4.11 Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro Jasco (modelo 710), junto ao Departamento de Física, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, sob supervisão do Prof. Dr. João Ruggiero Neto.

Os espectros de dicroísmo circular dos peptídeos foram coletados na região de UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 250 nm, à 25°C. A velocidade de varredura foi de 20 nm/min, utilizando-se uma largura de banda de 1,0 nm, sensibilidade de 20 miligraus, tempo de resposta de 1 s e 0,1 nm de resolução.

Os espectros finais foram obtidos a partir da média de seis acumulações e foram usadas cubetas de quartzo de caminho óptico de 0,5 cm ou 1 cm. Cada peptídeo foi solubilizado em tampão Tris (Merck) 5 mM, pH 8,0. À partir dessas soluções foram feitas preparações contendo diferentes concentrações de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) (MERCK) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (AMERSHAM BIOSCIENCES).

Fazendo-se a correção da linha de base, a elipticidade observada, θ (miligraus), foi convertida em elipticidade molar média, $[\Theta]$ (graus cm^2/dmol), usando a relação:

$$[\Theta] = \frac{100\theta}{lc}$$

onde “ l ” é o caminho óptico da cubeta em centímetros, c é a concentração do peptídeo em milimolar e “ n ” é o número de resíduos do peptídeo. Assumindo um modelo de dois estados, proposto por Rohl e Baldwin (Rohl e Baldwin, 1998), a elipticidade residual observada a 222 nm (Θ_{222}^{obs} em graus cm^2/dmol resíduo) foi convertida em porcentagem de hélice α (f_H) usando a seguinte equação:

$$f_H = \frac{\Theta_{222}^{obs} - \Theta_{222}^C}{\Theta_{222}^H - \Theta_{222}^C}$$

onde $\Theta_{222}^C = +640$ graus cm^2/dmol resíduo (Rohl e Baldwin, 1998) corresponde a elipticidade em 100% de *random coil* (conformação aleatória). Θ_{222}^H (graus cm^2/dmol resíduo) (Rohl e Baldwin, 1998) corresponde a elipticidade residual para uma estrutura 100% helicoidal e é dada por:

$$\Theta_{222}^H = -42000 (1 - (x/n))$$

onde n é o número de resíduos de aminoácidos e $x=3$, para peptídeos carboxiamidados, ou $x=4$, para peptídeos não-carboxiamidados.

4.12 Análises Estatísticas

O teste estatístico paramétrico utilizado foi à análise de variância ANOVA: um critério (Bonferroni), BioEstat 2.0 (AYRES *et al.*, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Separação e Purificação das Frações

O produto obtido pela extração foi submetido ao fracionamento por HPLC sob fase reversa em coluna semi-preparativa Nucleosil C-18 (250 x 10 mm), utilizando-se gradiente de MeCN de 5 a 60% (v/v) em 60 minutos, que resultou na eluição de 7 frações, como se pode observar na figura 5.1.

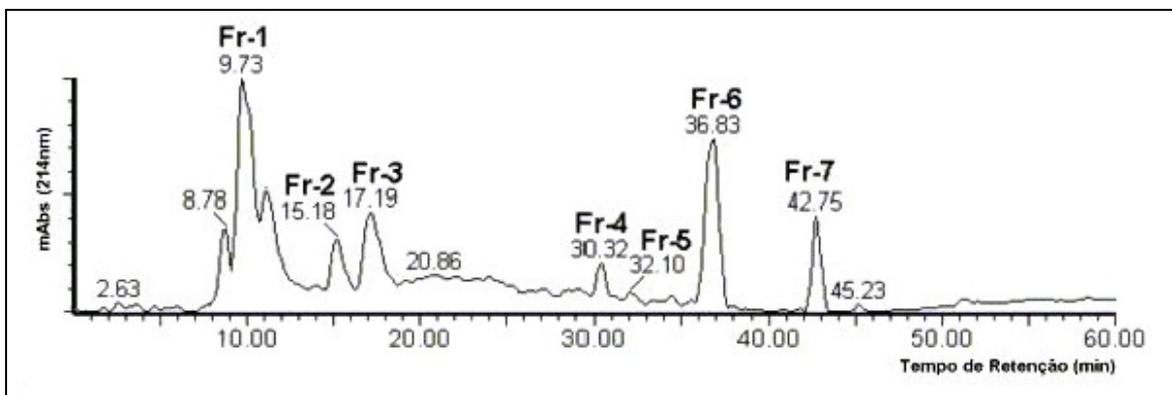


FIGURA 5.1: Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social *Agelaiia pallipes pallipes* sob HPLC de fase reversa, com coluna Nucleosil C-18 (250 x 10mm), sob gradiente linear de 5 a 60% (v/v) de MeCN (contendo TFA 0,1% (v/v)), em fluxo de 2.0ml/min, durante 60 min à temperatura de 27°C, monitorando-se a eluição no comprimento de onda de 214nm.

Cada fração foi coletada separadamente, liofilizada e em seguida, submetida a ensaios biológicos. Dentre as frações obtidas, a Fr-1 é uma mistura complexa de aminas biogênicas endógenas e neurotransmissores (MENDES *et al*, 2004); Fr-3, a Fr-4 e a Fr-5 correspondem a componentes peptídicos já investigados e identificados anteriormente.

5.2 Controle de Qualidade das Frações FR-2 e FR-6

Para as frações Fr-2 e Fr-6, que são as frações alvo deste trabalho, fez-se o controle de qualidade da purificação por análises de espectrometria de massas ESI-MS (figura 2). Na Figura 5.2a observa-se que Fr-2, apresenta apenas um único pico de carga +1 (m/z 629), enquanto que na Figura 5.2b a fração Fr-6, apresenta dois picos de carga: +1 (m/z 1210) e +2 (m/z 605).

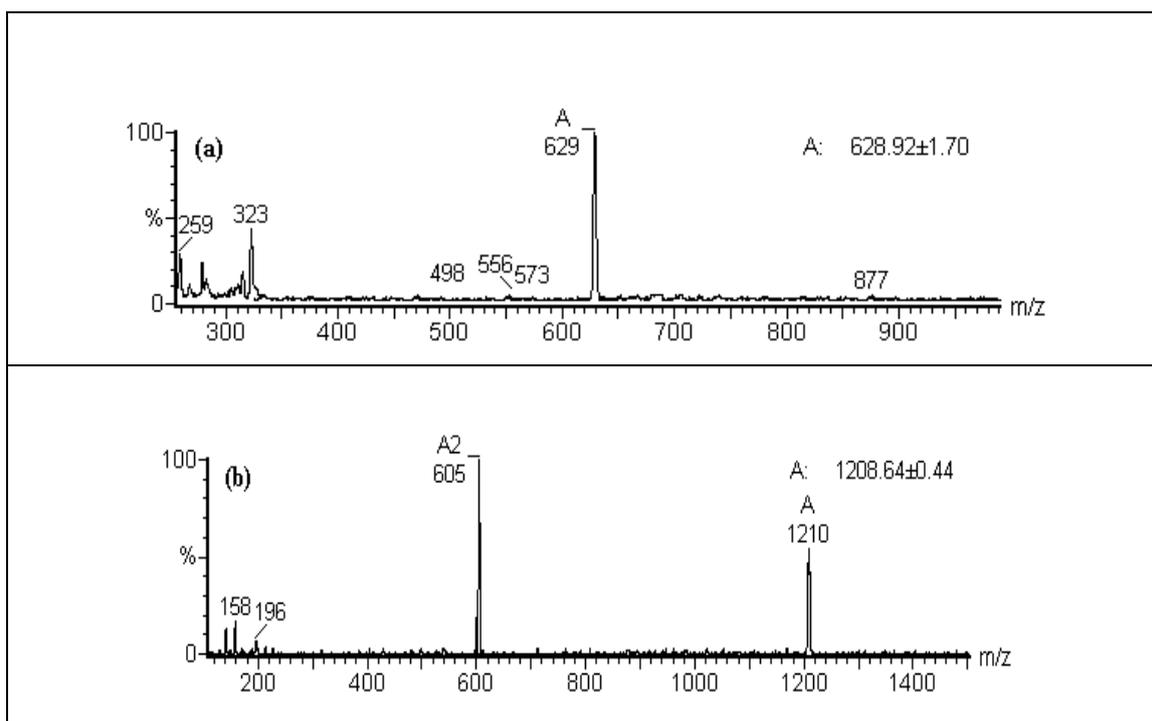


FIGURA 5.2: Espectros de massa do tipo ESI dos componentes peptídicos presentes nas frações Fr-2 (a) e Fr-6 (b) isoladas do veneno bruto da vespa social *Agelais pallipes pallipes*. Em (a) existe um pico de carga +1 na forma $[M+H]^+$ (m/z 629) e em (b) existem dois picos de carga: +1 na forma $[M+H]^+$ (m/z 1210) e +2 na forma $[M+2H]^+$ (m/z 605).

5.3 Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman

Conforme observado nos resultados na figura 5.2, não se verificou a existência de contaminantes importantes nas frações 2 e 6; desta maneira, pode-se afirmar que estas frações estavam suficientemente puras para serem submetidas ao seqüenciamento por Química Degradativa de Edman. O resultado obtido deste seqüenciamento foi o seguinte:



Fr-6: I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L-NH₂

As massas precisas destes dois peptídeos (628 Da para Fr-2 e 1209 Da para Fr-6) são compatíveis com o resíduo C-terminal na forma amidada (-NH₂).

Comparando-se as frações Fr-2 e Fr-6, concluímos que elas são idênticas nos seis primeiros aminoácidos, e diferem no fato de que a Fr-2 possui apenas seis resíduos de aminoácidos (a metade do tamanho de Fr-6, que possui 12 aminoácidos).

A Fr-6 apresenta a mesma seqüência peptídica descrita, em 1993, por Dohtsu e colaboradores para o peptídeo isolado do veneno da vespa *Protonectarina sylveirae* (I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L-NH₂), cujo nome se refere àquele do gênero onde primeiramente ela foi encontrada: Protonectina. Sendo assim, o nome dado ao peptídeo correspondente à Fr-6 se mantém como Protonectina. Um análogo dessa seqüência foi encontrado no veneno da vespa *Polistes rothnei iwatai*, onde os resíduos de glicina das posições 3 e 11 encontrados na seqüência original da Protonectina foram ambos substituídos por resíduos de serina. Esse peptídeo mostrou-se mais potente que os demais tipos de Protonectina isolados até o momento (MURATA *et al.*, 2006).

Com relação à fração Fr-2, a mesma foi designada por Protonectina (1-6), onde a numeração 1-6 se refere à posição dos seis primeiros resíduos de aminoácidos presentes nesta seqüência, quando comparados com a Protonectina. Em princípio, considerou-se a hipótese de que Fr-2 poderia ser produto da degradação de Fr-6; entretanto, observou-se que esta fração sempre esteve presente em todos os lotes de coletas de material já feita por nosso grupo (mesmo quando a extração e manipulação do veneno foi realizada em presença de inibidores de proteases), enquanto que Fr-6 esteve ausente em algumas coletas. O peptídeo Protonectina (1-6) também foi encontrado no veneno da vespa social *Parachartergus pseudopicalis*, diferindo apenas pela presença do resíduo C-terminal na forma ácida, perfazendo uma massa molecular de 629Da (Resende, *et al.* 2006, dado não publicado).

5.4 Síntese Manual por Química Fmoc e Espectrometria de Massas ESI-MS

A síntese das seqüências da Protonectina (1-6) e da Protonectina realizada manualmente em fase sólida, utilizou-se da química N-9-fluorenilmetoxicarbonil conforme descrito anteriormente no item “Materiais e Métodos” deste trabalho.

O controle de qualidade foi feito por espectrometria de massas ESI-MS e por seqüenciamento através Química Degradativa de Edman em um seqüenciador automático, confirmando que a síntese gerou seqüências esperadas.

O total de material sintético obtido para o Protonectina foi de 5,5 mg enquanto que para a Protonectina (1-6) foi de 5,0 mg, com rendimento médio de 30%.

5.5 Ensaio das Atividades Biológicas

Os ensaios de atividade biológica foram realizados para os peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) em concentrações de 10^{-6} M a 10^{-3} M, nas proporções molares de 1 a 4 [Protonectina:Protonectina (1-6)], conforme mostrado na TABELA 4.2 (item 4.7).

5.5.1 Ensaio da Atividade Hemolítica

Ensaio-se as atividades hemolíticas dos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) individualmente e nas proporções 1:1, 1:2 e 1:4. As concentrações utilizadas variaram de 10^{-6} M a 10^{-3} M.

A Figura 5.3 mostra os resultados dos ensaios de atividades hemolíticas em função da concentração dos peptídeos.

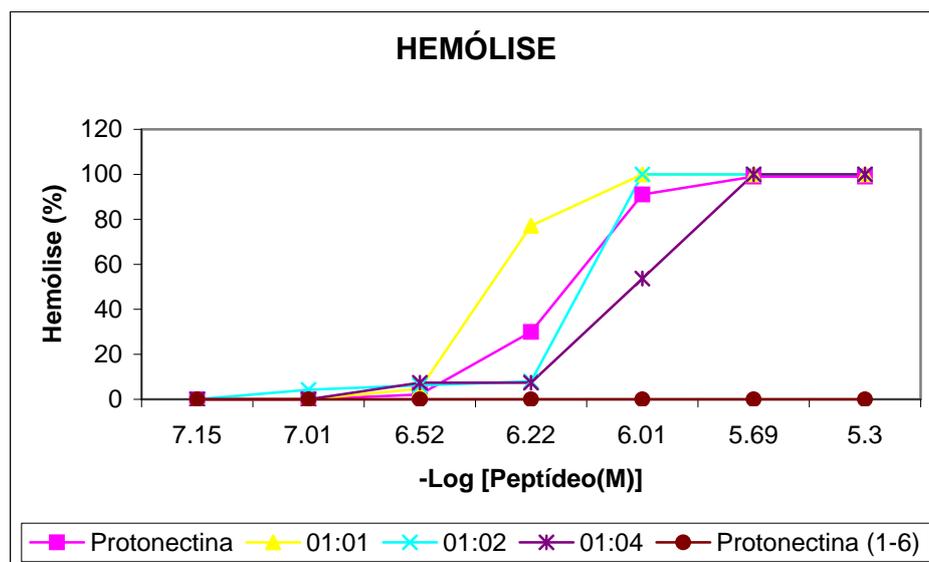


Figura 5.3: Ensaio de Hemólise de eritrócitos de sangue de ratos Wistar machos causados pelos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) individualmente, e de suas misturas nas proporções estequiométricas de 1:1, 1:2 e 1:4.

Estes resultados demonstraram que a Protonectina possui capacidade hemolítica, com um valor de $ED_{50} = 9,9 \times 10^{-7}$ M. Já a Protonectina (1-6), não apresentou nenhuma atividade hemolítica quando ensaiado isoladamente.

A mistura da Protonectina com Protonectina (1-6) na proporção 1:1 revelou um aumento de 87% na capacidade hemolítica causada pela Protonectina ($ED_{50} = 5,3 \times 10^{-7}$ M). Ao misturar esses dois peptídeos (Protonectina e Protonectina (1-6), respectivamente) nas proporções 1:2 e 1:4, não foi observado nenhuma alteração significativa em relação ao efeito causado pela Protonectina sozinha.

Também foram feitos testes estatísticos paramétricos do tipo ANOVA: um critério – Bonferroni, $p < 0,05$ (AYRES *et al.*, 2000), para todos os ensaios de atividade hemolítica. Duas hipóteses foram testadas:

H_0 - A proporção estequiométrica dos peptídeos não altera a resposta

H_1 - A proporção estequiométrica dos peptídeos altera a resposta.

Todos os resultados revelaram $p < 0,05$, concluindo-se que as diferenças observadas nos ensaios de hemólise em função das diferentes proporções estequiométricas entre os dois peptídeos foram significativas, portanto pode-se admitir a hipótese H_1 .

5.5.2 Ensaio da Atividade Degranuladora de Mastócitos

Ensaiou-se a capacidade degranuladora de mastócitos dos peptídeos individualmente, e nas proporções 1:1, 1:2 e 1:4, nas concentrações de 10^{-6} M a 10^{-3} M.

A Figura 5.4 mostra os resultados dos ensaios das atividades hemolíticas em função da concentração dos peptídeos.

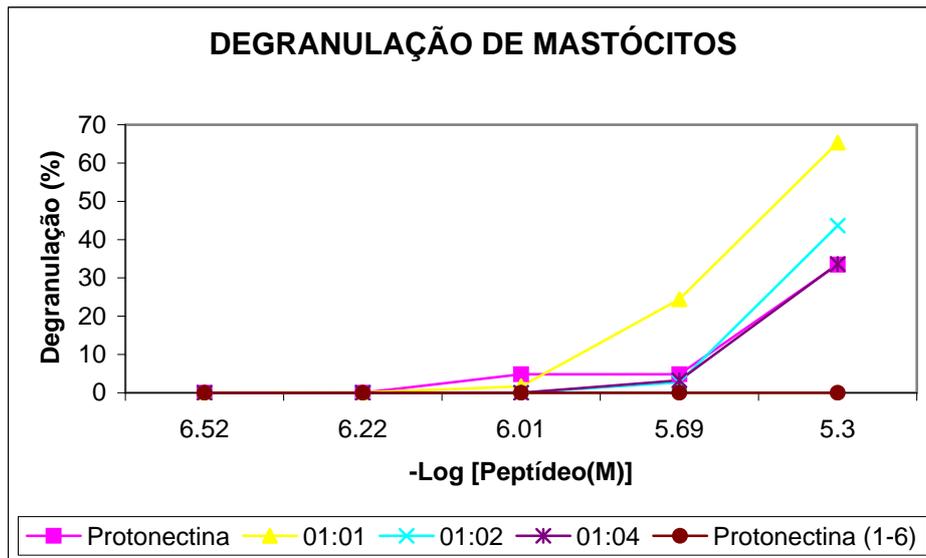


Figura 5.4: Ensaio de Degranulação de mastócitos de ratos Wistar machos pelos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) individualmente, e de suas misturas nas proporções estequiométricas de 1:1, 1:2 e 1:4.

Estes resultados demonstraram que a Protonectina possui alguma capacidade degranuladora de mastócitos peritoniais de ratos, apresentando um valor de $ED_{50} = 4,6 \times 10^{-6} M$. Já a Protonectina (1-6), não apresentou nenhuma atividade degranuladora de mastócitos, quando ensaiada isoladamente. Entretanto, as misturas de Protonectina e Protonectina (1-6) na proporção 1:1, mostraram um grande aumento na capacidade degranuladora de mastócitos causada pela Protonectina ($ED_{50} = 3,4 \times 10^{-7} M$). Ao misturarmos esses dois peptídeos (Protonectina e Protonectina (1-6), respectivamente), na proporção 1:2 e 1:4, não foi observado qualquer alteração significativa do efeito causado pela Protonectina sozinha. Portanto, a mistura de ambos os peptídeos na proporção de 1:1 causou uma ativação da atividade de liberação do conteúdo dos grânulos, em relação à Protonectina sozinha, da ordem de 35%.

Também foram feitos testes estatísticos paramétricos do tipo ANOVA: um critério – Bonferroni, $p < 0.05$ (AYRES *et al.*, 2000), para todos os ensaios de atividade degranuladora de mastócitos. Duas hipóteses foram testadas:

H_0 - A proporção estequiométrica dos peptídeos não altera a resposta

H_1 - A proporção estequiométrica dos peptídeos altera a resposta.

Todos os resultados revelaram $p < 0,05$, concluindo-se que as diferenças observadas nos ensaios de degranulação de mastócitos em função das diferentes proporções estequiométricas entre os dois peptídeos foram significativas, portanto admitiu-se a hipótese H_1 .

5.5.3 Ensaio da Medida da Liberação da Lactato Desidrogenase de Mastócitos (LDH)

Mediu-se, juntamente com a atividade degranuladora de mastócitos peritoniais de ratos, a liberação da enzima citoplasmática LDH, para a verificação da integridade dos mastócitos, em função do possível extravasamento do conteúdo do citoplasma. Este ensaio também foi realizado nas mesmas condições dos testes de atividade de degranulação de mastócitos descritos anteriormente.

A Figura 5.5 mostra os resultados do teste de liberação de LDH obtido em função das proporções estequiométricas dos peptídeos isoladamente e de suas misturas (10^{-6} M a 10^{-3} M).

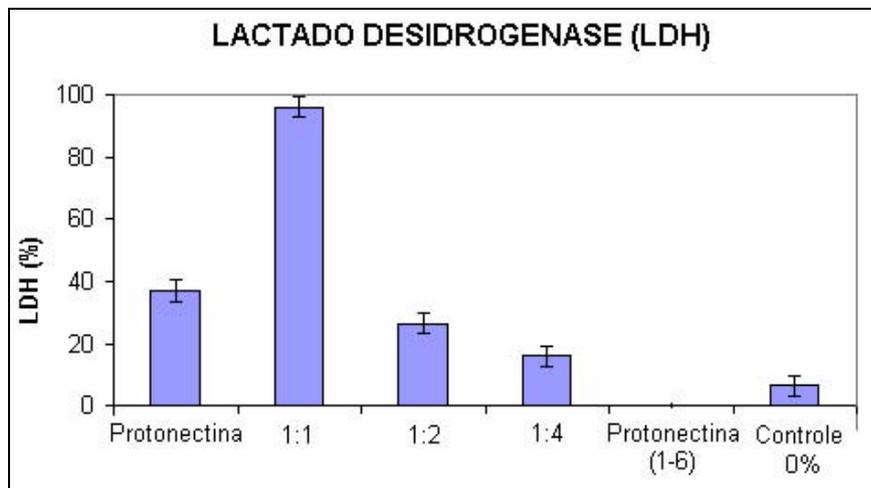


Figura 5.5: Ensaio de Lactato Desidrogenase (LDH) liberada pelos mastócitos de ratos Wistar machos induzida pelos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) individualmente e de suas misturas nas proporções estequiométricas de 1:1, 1:2 e 1:4.

Estes resultados demonstraram que a Protonectina sozinha causa alguma ruptura das membranas celulares dos mastócitos, provocando pequena liberação de LDH; enquanto que a Protonectina (1-6), não apresentou nenhum efeito tanto de degranulação quanto de lise celular. Entretanto, ao misturarmos a Protonectina com a Protonectina (1-6) na proporção 1:1, observou-se um forte aumento na liberação da enzima para o meio de incubação, em relação àquela liberação causada pela Protonectina sozinha. Ao misturarmos esses dois peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6), respectivamente, nas proporções 1:2 e 1:4, não foi observado nenhuma alteração significativa do efeito causado pela Protonectina sozinha (nestas condições não se alcançou os valores de ED_{50}).

Também foram feitos testes estatísticos paramétricos do tipo ANOVA: um critério – Bonferroni, $p < 0.05$ (AYRES *et al.*, 2000), para todos os ensaios de LDH. Duas hipóteses foram testadas:

H_0 - A proporção estequiométrica dos peptídeos não altera a resposta

H_1 - A proporção estequiométrica dos peptídeos altera a resposta.

Todos os resultados revelaram $p < 0,05$, concluindo-se que as diferenças observadas nos ensaios de LDH em função das diferentes proporções estequiométricas entre os dois peptídeos foram significativas, admitindo-se portanto a hipótese H_1 .

5.5.4 Ensaio da Atividade Quimiotática para Leucócitos Polimorfonucleares

Ensaiou-se a atividade quimiotática dos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) individualmente e nas proporções 1:1, 1:2 e 1:4, nas concentrações de 10^{-6} M a 10^{-3} M.

A Figura 5.6 mostra os resultados dos ensaios das atividades quimiotáticas de leucócitos polimorfonucleares obtidas para os peptídeos isolados e das misturas de ambos, em diferentes proporções estequimétricas.

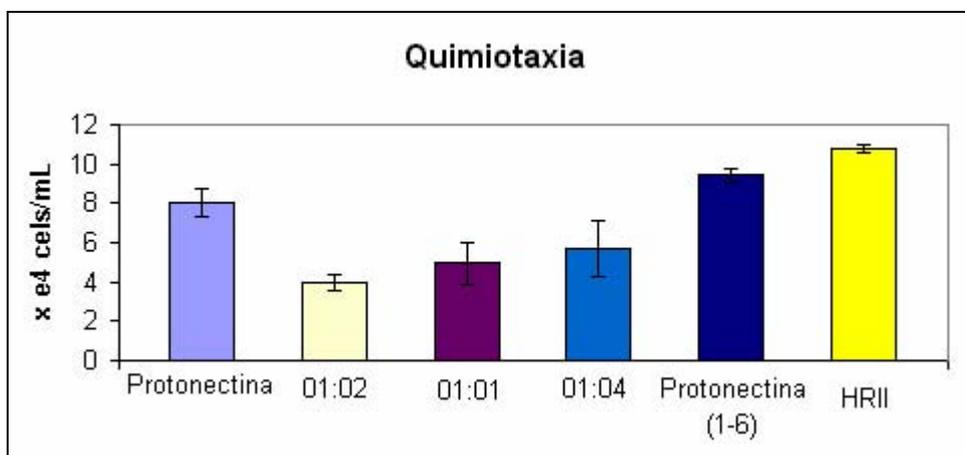


Figura 5.6: Ensaios de Quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, de ratos Wistar machos, induzida pelos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) individualmente, e de suas misturas nas proporções estequiométricas 1:2, 1:1 e 1:4.

Estes resultados demonstraram que a Protonectina possui alguma atividade quimiotática quando ensaiada sozinha, confirmando as afirmações de Dotsu *et al.* (1999). Surpreendentemente, apesar do reduzido tamanho o peptídeo Protonectina (1-6) apresentou atividade quimiotática, superior àquela causada pela Protonectina (Figura

6), sendo inclusive quase que de mesma intensidade que a atividade do peptídeo padrão HR-II.

Ao misturarmos a Protonectina com a Protonectina (1-6) na proporção 1:1, 2:1 e 1:2, observamos uma diminuição do efeito quimiotático da Protonectina ou Protonectina (1-6) sozinhos.

Também foram feitos testes estatísticos paramétricos do tipo ANOVA: um critério – Bonferroni, $p < 0.05$ (AYRES *et al.*, 2000), para todos os ensaios de atividade de quimiotaxia. Duas hipóteses foram testadas:

H_0 - A proporção estequiométrica dos peptídeos não altera a resposta quando comparadas com a Protonectina (1-6);

H_1 - A proporção estequiométrica dos peptídeos altera a resposta.

Todos os resultados revelaram $p < 0,05$, concluindo-se que as diferenças observadas nos ensaios de quimiotaxia para a Protonectina sozinha, e em mistura com diferentes proporções estequiométricas com Protonectina (1-6) foram significativas quando comparados com a atividade da Protonectina e/ou Protonectina (1-6) sozinhos, portanto pode-se admitir a hipótese H_1 .

A comparação geral entre todos os resultados obtidos nos ensaios biológicos são resumidos na Tabela 5.1:

Tabela 5.1: Comparação entre as atividades causadas pela protonectina e Protonectina (1-6).

Atividades Biológicas	Peptídeos	Atividade
Hemólise	Protonectina	+
	Protonectina (1-6)	-
	Mistura 1:1	++
Degranulação	Protonectina	++
	Protonectina (1-6)	-
	Mistura 1:1	+++
LDH	Protonectina	+
	Protonectina (1-6)	-
	Mistura 1:1	+++
Quimiotaxia	Protonectina	++
	Protonectina (1-6)	+++
	Mistura 1:1	+

Onde: (+) significa com atividade baixa, (++) significa atividade média, (+++) significa atividade elevada; (-) significa sem atividade, quando comparados com os efeitos de maior intensidade.

Muito embora a mistura de ambos os peptídeos testados diminua a atividade quimiotática para leucócitos polimorfonucleares (PMNL), isoladamente, essas moléculas exibem as mesmas características de outros peptídeos quimiotáticos já

descritos na literatura, como é possível verificar em: NAKAJIMA, 1986; NAGASHIMA *et al.*, 1990; Toki *et al.*, 1988; NAGASHIMA *et al.*, 1990; De Souza *et al.*, 2004/2005; Mendes *et al.*, 2004a,b; Xu *et al.*, 2006 Murata *et al.*, 2006.

5.6 Dicroísmo Circular

Os resultados das análises de dicroísmo circular obtidos até o momento foram analisados e expressos em termos da fração hélice- α observada, que utiliza como padrão espectros de máxima formação desta conformação, comparados com espectros que apresentam nos experimentos o mínimo de formação hélice- α . Todos os espectros foram corrigidos em termos de diluição. As proporções testadas foram 1:0 [Protonectina:Protonectina (1-6)], 0:1 [Protonectina:Protonectina (1-6)] e 1:1 [Protonectina:Protonectina (1-6)].

Na figura 5.7 são mostrados os espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectina, isoladamente, em água destilada, em solução de TFE 40% (v/v), em solução de SDS 165 μ M e solução de SDS 8mM.

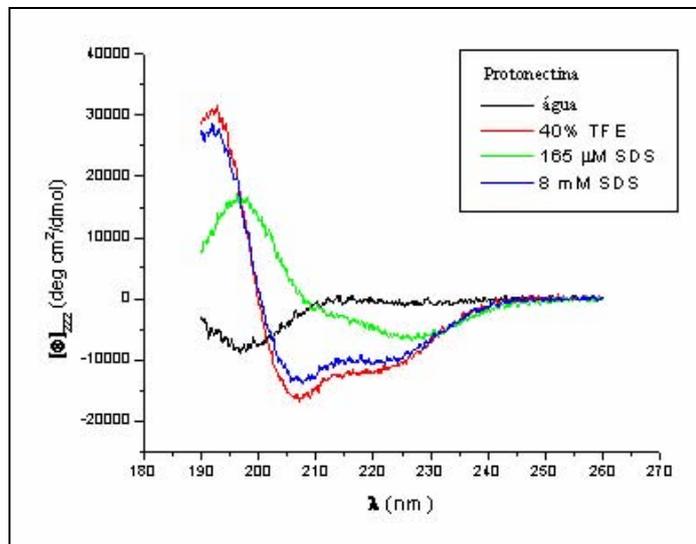


FIGURA 5.7: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectina, isoladamente, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165mM e 8mM e solução de TFE 40%.

Na figura 5.8 são mostrados os espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectina (1-6), isoladamente, em água destilada, em solução de TFE 40% (v/v), em solução de SDS 165 μ M e solução de SDS 8 mM.

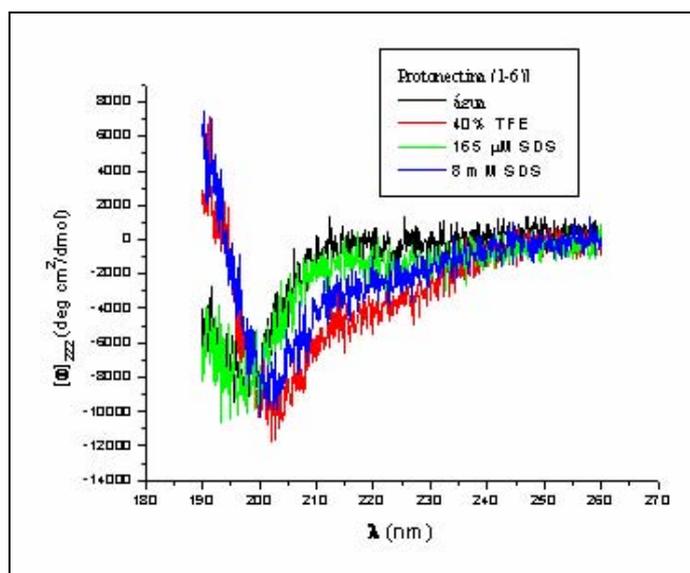


FIGURA 5.8: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectina (1-6), isoladamente, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165mM e 8mM e solução de TFE 40%.

Na figura 5.9 são mostradas os espectros de dicroísmo circular da mistura dos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6), na proporção 1:1 na presença de água, em TFE 40%, em presença de SDS 165 μ M e SDS 8mM.

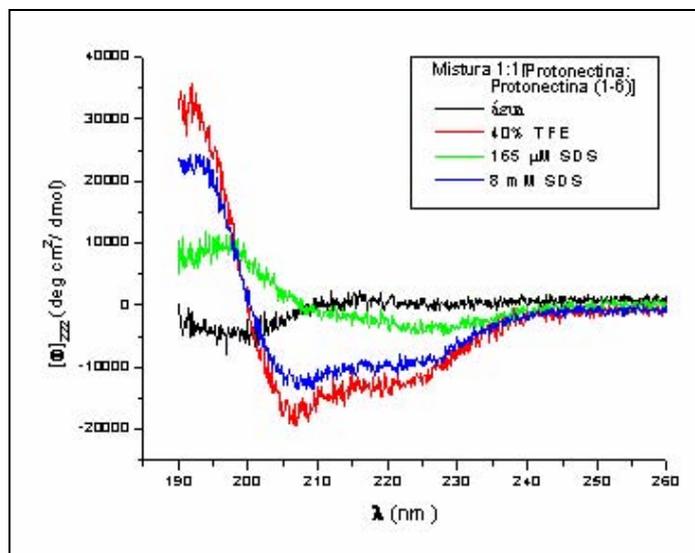


FIGURA 5.9: Espectros de dicroísmo circular da mistura na proporção 1:1 dos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6), obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165mM e 8mM e solução de TFE 40%.

Com base nas análises de dicroísmo circular, foi determinado que na presença de TFE, os peptídeos Protonectina e a Protonectina (1-6) tendem a formar 36,7% e 17,6% de hélices- α , respectivamente; enquanto que a mistura desses dois peptídeos na

proporção 1:1 aparentemente resultou numa estrutura supramolecular que apresentou 48,3% de hélices- α , conforme mostrado na tabela 8.

A tabela 5.2 resume as condições e resultados obtidos a partir das análises de dicroísmo circular para os peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) isoladamente, bem como para a mistura de ambos na proporção 1:1.

TABELA 5.2: Elipticidade molar em 222 nm e porcentagem de hélice- α dos peptídeos Protonectina e Protonectina (1-6) isoladamente e também da mistura de ambos na proporção 1:1, em solução aquosa, em solução de SDS 165 mM e 8 mM e TFE 40% (v/v).

Condição	Protonectina (1-6)		Protonectina		Mistura 1:1 [Protonectina: Protonectina (1-6)]	
	$[\Theta]_{222}$	f_H	$[\Theta]_{222}$	f_H	$[\Theta]_{222}$	f_H
Pep/ H₂O	-307.6	-0.009	-609.9	0.004	150.4	-0.025
Pep/ 40% TFE	-3855.5	0.176	-11138.8	0.367	-12918.8	0.483
Pep/ SDS < CMC	-798.1	0.016	-5235.9	0.164	-4214.8	0.145
Pep/ SDS > CMC	-2779.6	0.119	-10676.7	0.351	-9615.1	0.354

A formação de uma estrutura supramolecular resultante da interação entre ambos os peptídeos na proporção 1:1, é sugerida partir dos resultados de fração hélice- α , calculados a partir dos experimentos de dicroísmo circular, onde a supra-estrutura apresenta uma fração de hélice- α equivalente a somatória das frações de hélice- α dos peptídeos isolados.

Segundo Rosenfeld e colaboradores (2006), a combinação entre peptídeos (mesmo que pertencentes a famílias diferentes) pode aumentar o espectro da atividade antimicrobiana pela indução de mudanças nas propriedades biofísicas desses peptídeos, quando ligados as membranas lipopolissacarídicas.

6 CONCLUSÕES

Os compostos presentes em venenos de vespas sociais abriram portas para estudos de alergia e inflamação, sob o ponto de vista médico, farmacológico e imunológico (OLIVEIRA, 2000). O veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, apresentando peptídeos policatiônicos, biologicamente ativos e de grande importância biológica (Mendes *et al* 2004a, 2004b), se apresentam como alvos interessantes de caracterização molecular e funcional.

No presente trabalho as seqüências primárias dos peptídeos Protonectina (I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L-NH₂) e Protonectina (1-6) (I-L-G-T-I-L-NH₂) foram identificadas e posteriormente sintetizou-se cada um desses peptídeos, para estudos estruturais e funcionais. A seqüência de aminoácidos da Protonectina (1-6) corresponde aos seis primeiros resíduos de aminoácidos encontrados na seqüência primária da Protonectina.

Comparando-se as características dos resíduos de aminoácidos que compõem ambos peptídeos (Protonectina e Protonectina (1-6)) com os resultados obtidos a partir dos ensaios biológicos (Tabela 8) e com os resultados obtidos nas análises de dicróismo circular (Tabela 9), podemos propor que:

1. A Protonectina deve ser um peptídeo anfifílico, enquanto que Protonectina (1-6) é muito pequeno para assumir estrutura secundária anfifílica;

2. A Protonectina apresentou atividades hemolítica, degranuladora e de liberação de LDH de baixas intensidades e atividade quimiotática de elevada intensidade, características de interação com proteína-G.
3. A Protonectina (1-6) apresentou atividade quimiotática (características de interação com proteína-G), e nenhuma atividade hemolítica, degranuladora e de liberação de LDH.
4. A mistura de ambos peptídeos na proporção estequiométrica 1:1, resultou em grande potenciação das atividades hemolítica, degranuladora de mastócitos e de liberação de LDH (característica de interação com membranas), ao mesmo tempo em que essa mistura causou uma diminuição significativa na atividade quimiotática, quando comparadas com os resultados de cada peptídeo individualmente.
5. Análises de Dicroísmo Circular, na presença de TFE 40% (v/v), indicam que 1,0 dentre os 6 resíduos da Protonectina (1-6) analisada isoladamente, participaria da formação da estrutura em conformação de hélice- α ., enquanto que nessas mesmas condições, 4,4 resíduos dentre os 12 resíduos presentes na estrutura primária da Protonectina, analisada isoladamente, participariam da formação de hélices- α .
6. Entretanto, a análise de Dicroísmo Circular da mistura de ambos os peptídeos na proporção estequiométrica de 1:1, indicou a participação de 8,7 resíduos na formação da estrutura em hélice- α , dentre os 18 resíduos presentes na supra estrutura formada pela interação entre ambos os peptídeos. Este resultado fortalece as conclusões de que estes peptídeos estariam sim interagindo entre si, sendo responsáveis pelos efeitos potencializadores e/ou inibidores supra citados.

Com base nesses resultados, pode-se concluir que a Protonectina é um peptídeo multifuncional, apresentando atividades aparentemente dependentes de interação com Proteína-G: degranuladora de mastócitos e quimiotaxia para leucócitos

polimorfonucleares (PMN); enquanto que Protonectina (1-6) apresenta apenas quimiotaxia para PMN, quando ensaiado isoladamente. Esta é a primeira vez que se descreve um peptídeo tão pequeno, com atividade quimiotática para leucócitos polimorfonucleares.

É importante ressaltar que, devido ao fato da seqüência de aminoácidos da Protonectina (1-6) corresponder aos seis primeiros resíduos de aminoácidos encontrados na seqüência primária da Protonectina, pode-se concluir também que essa seqüência pode conter o motivo estrutural responsável pelo efeito quimiotático detectado.

Entretanto, quando associados entre si, parece que ambos formam uma estrutura supramolecular estável ao nível de estrutura secundária, a ponto de passar a apresentar fenômenos de interação com membranas das células animais, como por exemplo, intensa hemólise e ruptura de mastócitos, com subsequente diminuição das atividades tipicamente reguladas por proteínas-G.

Portanto, pode-se especular que o peptídeo Protonectina (1-6) estaria regulando as atividades do peptídeo Protonectina, determinando se as ações serão de baixas intensidades e reguladas pelos receptores acoplados a Proteínas G, ou de alta intensidade, exigindo a formação da supra-estrutura entre ambos os peptídeos, que por sua vez exerceria os efeitos farmacológicos por fenômenos de perturbação das membranas celulares.

7 REFERÊNCIAS

ARÉVALO, E., ZHU, Y., CARPENTER, J. M., STRASSMANN, J. E. The phylogeny of the social wasp subfamily polistinae: evidence from microsatellite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters. **BMC Evolutionary Biology**, London, 4:1-16, 2004.

ARGIOLAS, A., PISANO, J. J. Facilitation for phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. **J. Biol. Chem.** Washington, 258(22):13697-13702, 1983.

ARGIOLAS, A., PISANO, 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, 59(16):101-106, 1984a.

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, 260(3):1437-1444, 1984b.

AYRES, M., AYRES JUNIOR, M., AYRES, D. L., SANTOS, A.S. **BioEstat 2.0:** Aplicações Estatísticas nas Áreas de Ciências Biológicas e Médicas. Sociedade Civil de Mamirauá (Belém), Brasília, CNPq, 2000.

BELLARA, S. R., McFARLANE, C. M., THOMAS, C. R., FRYER, P. J. The growth of *Escherichia coli* in a food stimulant during conduction cooling: combining engineering and microbiological modelling. **Chem. Engineer. Sci.**, Berkeley, 55:6085-6095, 2000.

BERGMANN F, ISHAY I, KIDRON M. Pharmacologically active substances in the faeces of the oriental wasp, *Vespa orientalis*, **F. Br. J. Pharmacol.**, London, 26(1):229-36, 1966.

BROTHERS, D. J. Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to Mutillidae. **Scien. Bull. Univ. Kansas**, Lawrence, 50(11):483-648, 1975.

CASTRO FF, PALMA MS, BROCHETTO-BRAGA MR, MALASPINA O, LAZARETTI J, BALDO MA, ANTILA MA, ZUPPI LJ, CROCE J, COSSERMELLI W. Biochemical properties and study of antigenic cross-reactivity between africanized honey bee and wasp venom. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, Saint Louis, 4(1):37-41, 1994.

CHAUD-NETTO, J., GOBBI, N., MALASPRINA. **Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas**. In: BARRAVIERA, B. (Org). Venenos animais – uma visão integrada. EPUC, RJ, p.14-18, 1994.

COSTA, H., PALMA, M. S. Agelotoxin: a phospholipase A₂ from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera – Vespidae). **Toxicon**, Elmsford, 38:1367-1379, 2000.

CSORDÁS, A., MICHL, H. Isolation and structure of a hemolytic polypeptide from the defensive secretion of european *Bombina* species. **Monatsh. Chem.**, Wien, 101:182-9, 1970.

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.**, New Jersey, 18: 1095 – 1102, 2004.

de SOUZA, B. M., MENDES, M. A., SANTOS, L. D., MARQUES, M. R., CESAR, L. M., ALMEIDA, R. N., 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, 26(11):2157-64, 2005.

DYCK, M., KERTH, A., BLUME, A., LÖSHE, M. Interaction of the neurotransmitter, Neuropeptide Y, with phospholipid membranes: infrared spectroscopic characterization at the air/water interface. **J. Phys. Chem. Biol.** 110:22152-22159, 2006.

DOHTSU, K., OKUMURA, K., PALMA, M. S., NAKAJIMA, T. Isolation na sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Himenoptera – Vespidae). **Natural Toxins**, New York,1:271-6, 1993.

DUNN, R. S., PARKS, A. M. A new plasmakinin in the turtle, *Pseudemys elegans*. **Experientia**, Basel, 26:1220-1, 1970.

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

ESCRIBANO, L. M., GABRIEL, L. C., SAINZ, T., ROCAMORA, A., ARRAZOLA, J. M., NAVARRO, J. L. Peroxidase activity in human cutaneous mast cells: An ultrastructural demostnation. **J. Histochem Cytochem.**, Baltimore, 32:573-578, 1984.

EPAND, R. M., VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam,1462:11-28, 1999.

EVANS, H. E., EBERHARD, M. J. W., **The wasps**, Univ. Michigan Press, Ann Arbor, p.265. 1970.

FINDLAY SR, GILLASPY JE, LORD R, WEINER LS, GRANT JA. Polistes wasp hypersensitivity: diagnosis by venom-induced release of histamine in vitro. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, 60(4):230-5, 1977.

GILLASPY, J., E. **The impact on man of Polistes wasps with special reference to caterpillar suppression**, p.129-133. In: BREED, M. D., MICHENER, C. D., EVANS, H. E. *The biology of social insects*. Westview Press, USA, p.419, 1982.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**, Washington, 117:314-22, 1972.

HANCOCK, R. E. W. & CHAPPLE, D. S. Peptides antibiotics. **Antimicrobial agents Chemotherapy**, Bethesda, 43:1317-23, 1999.

HANCOCK, R. E. W. & DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in host defenses. **TIMS**, Providence, 8:402-410, 2000.

HANCOCK, R. E. W., FALLA, T., BROWN, M. H. Cationic bactericidal peptides. **Adv. Microb. Physiol**, London, 37:135-75, 1995.

HERMANN, H. R., BLUM, M. S. **Social insects** 2:77-197, 1981.

HIDE, I., BENNETT, J. P., PIZZEY, A., BOONEN, G., BAR-SAGI, D., GOMPERTS, B. D., TATHAN, P. E. R. Degranulation of individual mast cells in response to Ca²⁺ and guanine nucleotides: An All-or-None Event. **J. Cell. Biol**, New York, 123(3):585-593, 1993.

HIGASHIJIMA, T., UZU, S., NAKAJIMA, T., ROSS, E. M. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). **The journal of Biological Chemistry**, Washington, 263(14):6491-6494, 1988.

HIGASHIMA, T., UZU, S., NAKAJIMA, T., ROSS, E. M. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). **J. Biol. Chem.**, Washington, 263(14):6491-6494, 1988.

HIRAI, Y., YASUHARA, T., YOSHIDA, H., NAKAJIMA, T. A new mast cell degranulation peptide “mastoparan” in the venom of *Vespula lewisii*. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, 27(8):1942-1944, 1979a.

HIRAI, Y., YASUHARA, T., YOSHIDA, H., NAKAJIMA, T., FUJINO, M., KITADA, C. A new mast cell degranulation peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, 27(8):1945-6, 1979b.

HO, C. L., HWANG, L. L. Local edema induced by the black-bellied Hornet (*Vespa basalis*) venom and its components. **Toxicon**, Elmsford, 29:1031-42, 1991a.

HO, C. H. & HWANG, L. L. Structural and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. **Biochem.**, London, J. 274:453-456, 1991.

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, 259:259-64, 1994.

HO, C. L., LIN, Y. L., CHEN, W. C., HWANG, L. L., YU, H. M., WANG, K. T. Structural requirements for the edema-inducing and hemolytic activities of mastoparan-B isolated from the hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon**, Elmsford, 34(9):1027-1035, 1996.

HO, C. L., KO, J. L. Purification and characterization of a lethal protein with phospholipase A₁ activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, 963:414-422, 1988.

HOFFMAN, D. R. Antigen 5 and phospholipase from *Polistes dominulus* differ significantly in amino acid sequence from those of North American *Polistes* venoms. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, 99:S377, 1997.

HOFFMAN, D. R. Hymenoptera venom allergens. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, Saint Louis, 30:109-128, 2006.

KING, T. P., LU, G., GONZALEZ, M., QIAN, N. F., SOLDATOVA, L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, 98:588-600, 1996.

KING, G. F. The wonderful world of spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. **Toxicon**, Elmsford, 43:471-475, 2004.

KONNO, K., HISADA, M., ITAGAKI, Y., NAOKI, H., KAWAI, N., MIWA, A., YASUHARA, T., TAKAYAMA, H. Isolations and structure of pompilotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, 250:612-616, 1998.

KONNO, K., HISADA, M., NAOKI, H., ITAGAKI, Y., KAWAY, N., MIWA, A., YASUHARA, T., MOTIMOTO, Y., NAKAY, Y. Structure and biological activities of eumenine mastoparan – AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in venom of solitary wasp (*Antenynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**, Elmsford, 38:505-1515, 2000.

KONNO, K., HISADA, M., FONTANA, R., LORENZI, C. C. B., NAOKI, H., ITAGAKI, Y., MIWA, A., KAWAI, N., NAKATA, Y., YASUHARA, T., RUGGIERO NETO, J., AZEVEDO, W. F., PALMA, M. S., NAKAJIMA, T. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Bioch. Biophys. Acta.**, Amsterdam, 1550:70-80, 2001.

KONNO K, PALMA MS, HITARA IY, JULIANO MA, JULIANO L, YASUHARA T. Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. **Toxicon**, Elmsford, 40(3):309-12, 2002.

KONNO, K., HISADA, M., NAOKI, H., ITAGAKI, Y., FONTANA, R., RANGEL, M., OLIVEIRA, J. S., CABRERA, M. P., NETO, J. R., HIDE, I., NAKATA, Y., YASUHARA, T., NAKAJIMA, T. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. **Peptides**, New York, 2006.

KRISHNAKUMARI, V., NAGARAJI, R. Antimicrobial and hemolytic activities of cabrolin, a 13-residue peptide from the venom of European hornet, *Vespa cembro*, and its analogs. **J. Peptide Res**, Copenhagen, 50:88-93, 1997.

KURODA, Y., YOSHIOKA, M., KOBAYASHI, K., NAKAJIMA, T. Effects of peptides on the release of catecholamines and adenine nucleotides from cultured adrenal chromaffin cells. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B**, Tokyo, 56:660-4, 1980.

LAHIRI SC, SARANGI B. Acetylcholine, 5-HT and histamine in the venom of the wasp *Vespa cincta* Fabr. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, 69:505-12, 1979.

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

LU G, KOCHOUMIAN L, KING TP. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. **J Biol Chem.**, Washington, 3;270(9):4457-65, 1995.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interaction utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochem Biophys Acta**, Amsterdam,, 1462:1-10, 1999.

MEINWALD, J. **Sex, violence and drugs in the world of insects**: A Chemist's view. Adapted from a 2000 presentation by Jerrold Meinwald. Science on the Frontiers. Disponível em: <[Http://www.rescorp.org/science%20frontiers/meinwald.pd](http://www.rescorp.org/science%20frontiers/meinwald.pd)>. Acesso em: 13 Set. 2004.

MENDES, M. A., 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* by high performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, New Jersey, 181, 7, 2004a.

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

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

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

METZ, M., PILIPONSKY, A. M., CHEN, C. C., LAMMEL, V., ABRINK, M., PEJLER, G., TSAI, M., GALLI, S. J. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. **Science**, Washington, 313(5786):526-30, 2006.

METZ M, LAMMEL V, GIBBS BF, MAURER M. Inflammatory Murine Skin Responses to UV-B Light Are Partially Dependent on Endothelin-1 and Mast Cells. **The American Journal of Pathology**, Bethesda,169(3):815-822, 2006a.

MIZUNO, K., NAKAHATA, N., OHIZUMI, Y. Characterization of Mastoparan-Induced Histamine Release from RBL-2H3 Cells. **Toxicon**, Elmsford, 36(3):447-456, 1998.

MOR, A., NGUYEN, V. H., DELFOUR, A., MIGLIORE-SAMOUR, D., NICOLAS, P. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaceptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistry**, Washington, 30:8824-30, 1991.

MOR, A., NICOLAS, P. Isolation and structure of novel peptides from frog skin. **Eur. J. Biochem**, Berlin, 219:145-54, 1994.

MOUSLI, M., BUER, J. L., BRONNER, C., ROUOT, B., LANDRY, Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. **TIPS**, Elon College, 11:358-62, 1990.

MURATA, K., SHINADA, T., OHFUNE, Y., HISADA, M., YASUDA, A., NAOKI, H., NAKAJIMA, T. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. *Biol Pharm Bull*, Tokyo, 29(12):2493-2497, 2006.

NAGASHIMA, K., KOIKE, M., SAITO, K., YASUHARA, T., TSUKAMOTO, Y., MORI, M., FUJINO, M., NAKAJIMA, T. Role of lysine residue at 7th position of wasp chemotactic peptides. **Biochem. and Bioph. Research Commun.**, Orlando, 168:844-849, 1990.

NAKAJIMA, T., YASUHARA, T., ERSPAMER, G. F., VISSER, J. Occurrence of Hyp³-bradykinin in methanol extracts of the skin of the South African leptodactylid from *Heleopryne purcelli*. **Experientia**, Basel,35:1133, 1979.

NAKAJIMA, T. **Pharmacological biochemistry of vespid venom**. In: PIEK, T. (Ed.) *Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behaviour aspects*. London: Academic press Inc. Ltd. p.309-27, 1986.

NAKAJIMA, T., UZU, S., WAKAMATSU, K., SAITO, K., MIYAZAWA, T., YASUHARA, T., TSUKAMOTO, Y., FUJINO, M. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, New York, 25:115-21, 1986.

OLIVEIRA, M. R. & PALMA, M. S., Polybitoxins: A group of phospholipases A₂ from the venom of the neotropical social wasp “paulistinha” (*Polybia paulista*). **Toxicon**, Elmsford, 369(1):189-199, 1998.

OLIVEIRA, M. R. P. **Efeitos do veneno bruto de *Polybia (Mirapetra) paulista* (LEHRING, 1896) em camundongos: estudos bioquímicos, farmacológicos e morfológicos**. Rio Claro, 135p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2000.

OKUMURA, K., INUI, K., HIRAI, Y., NAKAJIMA, T. The effect of mastoparan of ion movement in black lipid membrane. **Biomed. Res**, Tokyo, 2:450-2, 1981.

OTVOS Jr, L., BOKONYI, K., VARGA, I., OTVOS, B., HOFFMANN, R., ERTL, H. C. J., WADE, J. D., McMANUS, A. M., CRAIK, D. J., BULET, P. Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection. **Protein Science**, New York, 9(4):742-9, 2000.

PALMA, M. S., BRAGA, M. R. B. **Venenos de “Hymenoptera” sociais: Coleta, composição, bioquímica e mecanismos de ação**. In: BARRAVIERA, B. (Org). *Venenos animais – Uma visão integrada*. EPUC, RJ, p.251-258, 1994.

PANTERA B, HOFFMAN DR, CARRESI L, CAPPUGI G, TURILLAZZI S, MANAO G, SEVERINO M, SPADOLINI I, ORSOMANDO G, MONETI G, PAZZAGLI L. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, 13;1623(2-3):72-81, 2003.

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, 36:793-801, 1994.

PARK, R. **Bee and Hymenoptera stings**. Emedicine 3(1), 2002. (www.emedicine.com).

PIEK, T. Venoms of Hymenoptera – **Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects**. Academic Press, London, 1986.

PIRPIGNANI, M. L., RIVERA, E., HELLMAN, U., BISCOGLIO DE JIMENEZ BONINO, M. Structural and immunological aspects of *Polybia scutellaris* Antigen 5. **Arch Biochem Biophys**. 407(2):224-30, 2002.

PISANO, J. J. Vasoactive peptides in venoms. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, Bethesda, 27:58-62, 1968.

RASNITSYN, A. P., QUICKE, D. L. J. **History of Insects**. Kluwer Academic Publishers, p. 242-254, 2002.

REES, J. A., MONIATTE, M., BULET, P. Novel antibacterial peptides isolated from European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). **Insect Biochem. Molec. Biol.**, Oxford, 27(5):413-22, 1997.

REDDY, K. V. R., YEDERY, R. D., ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antim Agents*, New York, 24:536-547, 2004.

RICKARD, A., LAGUNOFF, D. Eosinophil peroxidase accounts for most if not all peroxidase activity associated with isolated rat peritoneal mast cells. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, Saint Louis, 103:365-369, 1994.

ROSENFELD, Y., BARRA, D., SIMMACO, M., SHAI, Y., MANGONI, M. L. A synergism between temporins toward Gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. **The J. of Biological Chem.**, Washington, 281 (39): 28565-28574, 2006.

ROSS, E. M., HIGASHIJIMA, T. Regulation of G-protein activation by mastoparans and other cationic peptides. **Methods in Enzymol.**, New York, 237:26-37, 1994.

SHAI, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. **Trends Biochem Sci**, London, 20(11):460-464, 1995.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, 1462:55-70, 1999.

SHAI, Y. From innate immunity to de-Novo designed antimicrobial peptides. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, 8:715-725, 2002.

SHPAKOV, A.O., PERTSEVA, M. N. Molecular mechanisms for the effect of mastoparan on G proteins in tissues of vertebrates and invertebrates. **Bull Exp Biol Med**, New York, 141(3):302-6, 2006.

SPRADBERY, J. P. **Wasps – An Account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps**. Sidgwick & Jackson, London, p.1-12, 1973.

TOKI, T., YASUHARA, T., NAKAJIMA, T. Isolation and sequential analysis of peptides on the venom sac of *Parapolybia indica*. **Jpn. J. Saint. Zool.**, Tokyo, 39(2):105-11, 1988.

TUICHIBAEV, M. U., AKMEDOVA, 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, 53(2):219-26, 1988.

XU, X., LI, J., LU, Q., YANG, H., ZHANG, Y., LAI, R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. **Toxicon**, Elmsford, 47:249-253, 2006.

YEAMAN, M. R., YONT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, Baltimore., 55(1):27-55, 2003.

WAKAMATSU, K., HIGASHIMA, T., FUJINO, M., NAKAJIMA, T., MIYAZAWA, T. Transferred NOE Analyses of conformations of peptides as bound to membrane bilayer of phospholipid; Mastoparan-X. **Elsevier Science Publishers**, 162(1):123-126, 1983.

WIEPRECHT, T., DATHE, E., KRAUSE, E., BEYERMANN, M., MOLLOY, W. L., MacDONALD, D. L., BIERNET, M. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **FEBS Lett**, Amsterdam, 417:135-40, 1997.

WIGGER, E., KUHN-NENTWING, L., NENTWING, W. The venom optimisation hypothesis: a spider injects large venom quantities only to difficult prey types. **Toxicon**, Elmsford, 40:749-752, 2002.

WILSON, E. O. **The insects and man**. In: BREED, M. D., MICHENER, C. D., EVANS, H. E. *The biology of Social Insects*. Westview Press, Colorado, p.1-3, 1982.

WU, M., HANCOCK, R. E. W. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide batenecin with the outer and cytoplasmic membrane. **J. Biol. Chem.**, Washington, 274:29- 35, 1999.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, 84:5449-54, 1987.