



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE TOXINOLOGIA



Identificação e avaliação do efeito antinociceptivo da Protonectina natural e modificada da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*

Orientanda: Priscilla Galante Ribeiro

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Renata Mortari

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisabeth Ferroni Schwartz

**Brasília - DF, Agosto de 2013.**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE TOXINOLOGIA



Identificação e avaliação do efeito antinociceptivo da  
Protonectina natural e modificada da peçonha da vespa social  
*Parachartergus fraternus*

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal da Universidade de  
Brasília, como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre em  
Biologia Animal.

**Priscilla Galante Ribeiro**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Renata Mortari**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Ferroni Schwartz**

**Brasília-DF, Agosto de 2013**



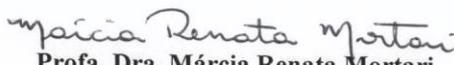
Dissertação de Mestrado

**PRISCILLA GALANTE RIBEIRO**

Título:

**"Identificação e avaliação do efeito antinociceptivo da Protonectiva natural e modificada da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*."**

Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. Márcia Renata Mortari  
Presidente / Orientadora  
UnB



Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni  
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa  
UNAERP

  
Profa. Dra. Karla Graziella Moreira  
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa  
UEG

Profa. Dra. Marisa Rangel  
Membro Suplente  
Externo não Vinculado ao Programa  
INSTITUTO BUTANTAN

Brasília, 28 de agosto de 2013.

# Dedicatória

Aos meus pais, Marta e Nélio

Aos meus avós, Geny, Eunice, Nilson e José

# Agradecimentos

- ✓ Ao meu Deus, amigo fiel em todos os momentos
- ✓ A minha mãe linda, sábia e poderosa
- ✓ Aos meus tios e tias pelo carinho constante
- ✓ As minhas amigas queridas, Andréia Biolchi, Fernanda Natario e Lucianna Couto
- ✓ A minha orientadora Márcia pelo cuidado, atenção e ensinamentos
- ✓ A minha co-orientadora Elisabeth pela oportunidade
- ✓ Ao meu querido pupilo Gabriel Avohay
- ✓ As meninas super poderosas da neurofarmaco: Jacqueline, Flávia, Lilian, e Juliana
- ✓ Aos meninos da neurofarmaco: Rafael, Rômulo e Marcos
- ✓ Ao Adolfo por tantas diluições
- ✓ Aos professores do Ltx: Carlos Schwartz e Osmindo Junior pelo apoio
- ✓ Ao Júlio pelos sequenciamentos e ajuda.
- ✓ A todos os meus colegas do Ltx pelas ajudas e cias
- ✓ Aos técnicos Washington e César
- ✓ A Dona Maria pelos chás quentinhos e cafés deliciosos
- ✓ As meninas da secretaria, Dani, Ana e Kelly
- ✓ Ao CNPq, CAPES e FAPDF, pelo apoio financeiro
- ✓ Ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Animal pela oportunidade
- ✓ As vespas e camundongos

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Peçonhas de animais .....	1
1.2 Moléculas biologicamente ativas isoladas de vespas.....	4
1.2 1.3 A vespa social <i>Parachartergus fraternus</i> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1 Coleta das vespas e extração das peçonhas .....	15
3.2 Obtenção da peçonha .....	16
3.3 Isolamento e identificação do peptídeo .....	17
3.4 Transcritômica .....	18
3.5 Bioensaios .....	31
3.6 Ensaio hemolítico .....	36
3.7 Análise estatística.....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 Coleta e extração da peçonha.....	38
4.2 Fracionamento e Análise do peptídeo de <i>P. fraternus</i> .....	38
4.3 Construção da Biblioteca de cDNA.....	43
4.4 Desenho e Síntese do peptídeo modificado .....	49
4.5 Efeito antinociceptivo da Protonectina natural e sintética em modelo de indução de dor térmica - Placa quente. ....	50

4.6	Ensaio hemolítico e Teste de Déficit Motor .....	54
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## Lista de figuras

**Figura 1:** A- Colônia de *Parachartergus fraternus* localizada no estacionamento do Instituto Central de Ciências Ala Sul (ICC-Sul) da Universidade de Brasília-UnB. B- Exemplar de *Parachartergus fraternus*. Foto com lupa no aumento de 6X. Pag.15

**Figura 2:** Mapa do vetor linear pSMART2IF e sítio de clonagem In-Fusion. Pag. 26

**Figura 3:** Em destaque assinalado pela seta está o ponto do bregma utilizado para realizar a estereotaxia para implantação da cânula-guia no ventrículo lateral direito cerebral. Pag. 32

**Figura 4:** Modelo do Rotarod utilizado para avaliação de déficit motor nos camundongos. Pag. 35

**Figura 5:** Análise macroscópica para visualizar o local da injeção e a posição da cânula guia no ventrículo direito cerebral com ajuda do corante azul de metileno. Pag. 36

**Figura 6:** Perfil cromatográfico dos compostos de baixa massa molecular (até 3000 Da) da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. Pag. 40

**Figura 7:** O espectro de massa da fração 9 obtido pelo equipamento MALDI/TOF. Pag. 41

**Figura 8:** Determinação da sequência do peptídeo correspondente à fração 9 destacando-se a ambiguidade na resolução dos aminoácidos Isoleucina e Leucina. Realizado no MALDI-TOF/TOF no método LIFT. Pag. 42

**Figura 9:** Perfil eletroforético do RNA total da glândula da peçonha da vespa social *P.fraternus*. Pag. 43

**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 1%. Coluna 1- Marcador molecular 1kb plus (Invitrogen). Coluna 4 - Dupla fita. Pag. 44

**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose 1% de 5 amostras dos cDNAs da biblioteca obtido a partir da lise alcalina da biblioteca. Pag. 45

**Figura 12:** Sequência nucleotídica e peptídica do transcrito obtido *P. fraternus*. Pag. 46

**Figura 13:** Alinhamento ClustalW dos precursores de Protonectina de *Parachartergus fraternus* (*P. fraternus*), *Orancistrocerus drewseni* (*O. drewseni*), *Vespa magnifica* (*V. magnifica*) e do precursor de mastoparano de *Vespa affinis* (*V. affinis*). Pag. 47

**Figura 14:** Alinhamento ClustalW dos peptídeos maduros de Protonectina de *Parachartergus fraternus* (*P. fraternus*), *Agelaia pallipes pallipes* (*A. pallipes pallipes*), *Protonectarina sylveirae* (*P. sylveirae*), *Polybia paulista* (*P. paulista*), *Orancistrocerus drewseni* (*O. drewseni*), *Vespa magnifica* (*V. magnifica*). Pag. 48

**Figura 15:** Índice de antinocicepção (IA) das latências de escape da placa quente após injeção i.c.v. da Protonectina sintética (F) em camundongos. Pag. 51

**Figura 16:** Área abaixo da curva do Índice de antinocicepção de Protonectina F da placa quente (*hot-plate*). Pag. 52

**Figura 17:** Índice de antinocicepção (IA) das latências de escape da placa quente após injeção i.c.v. da Protonectina natural em camundongos. Pag. 53

**Figura 18:** Área abaixo da curva do Índice de antinocicepção de Protonectina natural da placa quente (*hot-plate*). Pag. 54

**Figura 19:** Ensaio hemolítico usando diferentes concentrações da Protonectina. Pag. 56

**Figura 20:** Ensaio de déficit motor em Rotarod usando diferentes concentrações de Protonectina e Protonectina - F. Pag. 56

### **Lista de tabelas**

**Tabela 1.** Mastoparanos encontrados em vespas

**Tabela 2.** Cininas encontradas em vespas.

### **Lista de quadros**

**Quadro 1.** Reação para síntese da 1ª fita de cDNA.

**Quadro 2.** Reação para a síntese da 2ª fita de cDNA.

**Quadro 3.** Reação para clonagem no vetor linear pSMART2IF

**Quadro 4.** Sequência dos iniciadores 5' e 3'.

**Quadro 5.** Mix da PCR de colônia

## Lista de abreviaturas dos aminoácidos

<b>Nome</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Abreviatura</b>
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Gutamina	Gln	Q
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

## Lista de abreviaturas

Abs: absorbância

ACN: acetonitrila

Ampr: resistência à ampicilina

AP: antero-posterior

AUC: *Area under curve*/ Área sob a curva

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BVA: acupuntura com peçonha de abelha

CBMM: compostos de baixa massa molecular

cDNA: DNA complementar

CEUA: comitê de ética em uso animal

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CONCEA: conselho nacional de controle na experimentação animal

ds cDNA: *Double-strand cDNA*/ 2ª fita de cDNA

DV: dorso-ventral

E.P.M.: erro padrão da média

EST: *Expressed sequence tags*

GABA: ácido gama-aminobutírico

I.A: índice de antinocicepção

i.c.v: via intracerebroventricular

i.p: via intraperitoneal

K+:: potássio

kb: kilobase

LA: latências de antinocicepção

m/z: relação massa/carga

Miniprep: Preparação de DNA plasmidial em pequena escala

ML: meso-lateral

mRNA: RNA mensageiro

MS/MS: *Tandem Mass Spectrometry*/ espectrometria de massa sequencial

MS: *Mass Spectrometry*/ espectrometria de massa

P LAC: promotor Lac

Pb: Pares de base

PCR: Polymerase chain reaction/ reação em cadeia da polimerase

PMTX: pompilidotoxinas

Protonectina - F: protonectina sintetizada

RPM: rotações por minuto

S.E: suspensão de eritrócitos

SNC: sistema nervoso central

TFA: ácido trifluoroacético

Thr6-BK: treonina6-bradicinina

TTX: tetrodotoxinas

V/V: volume/volume

Ves-CPs: peptídeos quimiotáticos de vespas

VL: ventrículo lateral cerebral

## RESUMO

Peçonhas de vespas são formadas por um conjunto de moléculas com diversas ações farmacológicas, como as aminas biogênicas, as acilpoliaminas e os peptídeos, sendo estes últimos os mais abundantes. Atualmente, compostos neuroativos isolados de peçonhas de animais tem despertado grande interesse devido a seu potencial no desenho de novas drogas para prevenir ou tratar doenças como dor crônica, epilepsia e Parkinson, assim como novas ferramentas farmacológicas. Neste contexto, o estudo da peçonha de vespas tem proporcionado à descoberta de novos compostos neuroativos, mas, ainda, até o momento, a grande maioria dos peptídeos não foi identificada e avaliada. A vespa social *Parachartergus fraternus* tem uma marcante peculiaridade: embora estas vespas vivam em comunidade, a ação da sua peçonha é capaz de paralisar a presa de modo irreversível e não letal o que difere de outras vespas sociais que a utiliza apenas para proteção contra predadores. Esta diferença indica a presença de compostos com ação em estruturas do sistema nervoso. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi a identificação e o isolamento de peptídeos antinociceptivos da peçonha de *P. fraternus*. A peçonha de *P. fraternus* foi analisada por duas estratégias: fracionamento por CLAE seguido de MALDI/TOF e a construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento. Uma fração específica foi separada por CLAE e após ser sequenciada *de novo*, teve sua sequência parcialmente determinada, com diversas ambiguidades e especialmente, entre Leucina e Isoleucina. Em relação ao transcrito, um clone da biblioteca de cDNA foi identificado que codifica o peptídeo, o que possibilitou a completa determinação da sequência peptídica. A análise do sequenciamento revelou a presença de um precursor do peptídeo maduro, composto por um propeptídeo de 61 aminoácidos e com um possível sinal de clivagem. A sequência do peptídeo maduro foi determinada como ILGTILGLLKGL-NH<sub>2</sub>. Após busca nos bancos de dados, este peptídeo mostrou homologia com a Protonectina, identificada anteriormente na vespa *Protonectarina sylveirae*. Para o peptídeo sintético, duas modificações foram desenhadas e o peptídeo IFGTILGFLKGL-NH<sub>2</sub> foi produzido por síntese em fase sólida (Aminotech®). A atividade antinociceptiva dos dois peptídeos foi avaliada utilizando o modelo de placa quente em camundongos *Swiss* (n=4-6/grupo). Os peptídeos foram injetados por via i.c.v. nas concentrações de 16 e 8 nmol/animal diluídas em solução veículo quatro dias após a implantação da cânula guia. Como controle positivo foi utilizado morfina (16nmol/animal) e como controle negativo foi utilizado água deionizada como veículo. A atividade antinociceptiva do peptídeo natural foi efetiva na concentração de 8 nmol/animal em 90, 120 e 240 min (p<0,05), enquanto que na concentração de 16 nmol/animal mostrou um efeito menor, provavelmente devido à neurotoxicidade. Já o peptídeo sintético mostrou uma resposta dose-dependente, sendo que na concentração de 16 nmol/animal a atividade antinociceptiva não diferiu estatisticamente (p>0,05) da morfina em todos os tempos testados (240min). O peptídeo sintético não mostrou atividade hemolítica, assim como o descrito na literatura para o peptídeo natural. Ao contrário do peptídeo natural, animais injetados com o peptídeo sintético não apresentaram déficit motor, na maior dose testada no teste de antinocicepção. Esses resultados corroboram a hipótese de que a peçonha de vespas possui um grupo de moléculas que atuam no SNC de mamíferos. O peptídeo sintético mostrou potencial de contribuir com o desenvolvimento da neurociência na elucidação da transmissão sináptica e no desenho de novas drogas

Palavras-chaves: *Parachartergus fraternus*, peptídeo antinociceptivo, CLAE, cDNA

## ABSTRACT

Wasp venoms are formed by several molecules, such as biogenic amines, acylpoliamines and peptides which are the most abundant component. Neuroactive compounds are of great interest for their relevant potential to design new drugs, important to prevent and/or treat diseases such as chronic pain, epilepsy and Parkinson, as well as to develop other pharmacological tools. In this context, the study of wasp venoms has led to the discovery of neuroactive molecules, however most peptides have yet to be identified or characterized. The social wasp *Parachartergus fraternus* has a remarkable peculiarity: although these wasps live in community, their venom act by irreversibly and non-lethally paralyzing their prey, which differs from other social wasps, which typically uses the venom only for protection against prey. This difference in the mode of action suggests the presence of compounds with activity in the nervous system. For this reason, the aim of this study was the identification and isolation of antinociceptive peptides in the venom of *P. fraternus*. The venom of *P. fraternus* was analyzed by two complementary strategies: HPLC fractionation followed by MALDI-TOF analysis and cDNA library construction and sequencing. A specific fraction was identified by mass spectrometry (MALDI-TOF), however sequencing of this fraction was unable to unambiguously determine between Leucine and Isoleucine. Using the transcriptomic approach, the sequence of the precursor encoding this peptide was identified. The precursor encodes a propeptide of 61 amino acids with a putative signal peptide. The sequence of the mature peptide was determined as ILGTILGLLKGL-NH<sub>2</sub>. Similarity search in public databases showed that this peptide is identical to Protonectin isolated from *Protonectarina sylveirae*. A synthetic peptide with two amino acid substitutions, IFGTILGFLKGL-NH<sub>2</sub>, was produced by solid phase synthesis (Aminotech). Antinociceptive activity of both peptides was evaluated by the hot plate model in Swiss mice (n=4-6/group). The peptides were infused via i.c.v. at doses of 16 and 8 nmol/animal (in vehicle solution) four days after the implantation of the guide cannula. Morphine (16nmol/animal) was used as positive control and vehicle solution was used as negative control (2µL/animal). The analgesic activity of the natural isolated peptide was shown to be effective at 8 nmol/animal (p<0.05) in the time points of 90, 120 and 240 min whereas the higher dose of 16 nmol/animal showed a decreased effect, probably due to neurotoxicity. The synthetic peptide had a dose-dependent response, where the highest dose (16 nmol/animal) showed antinociceptive activity that did not differ (p<0.05) from morphine in all time points tested (240min). The synthetic peptide did not show hemolytic activity, similar to the natural peptide as shown in previous studies. Contrary to the natural peptide, animals injected with the higher dose of the synthetic peptide (16nmol/animal) did not show motor deficit in the antinociceptive test. Together, these results support the hypothesis that wasp venoms have a group of molecules with activity in the CNS of mammals. The synthetic peptide tested here showed the potential to contribute to the development of neuroscience in the elucidation of synaptic transmission and also in the design of new drugs

Keywords: *Parachartergus fraternus*, Antinociceptive peptide, HPLC, cDNA.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Peçonhas de animais

Ao longo do processo evolutivo, por milhões de anos, alguns animais desenvolveram a capacidade de produzir e armazenar uma série de compostos biologicamente ativos (venenos e peçonhas) com um relevante papel na captura do alimento, podendo paralisar e/ou matar sua presa, e na proteção contra os predadores. As vantagens ecológicas conferidas pela posse de um sistema de peçonha são evidentes e podem ser comprovada pela extraordinária e diversificada gama de animais que evoluíram estas peçonhas para fins de predação, defesa, ou concorrente intimidação (King, 2011). Uma definição genérica, mas bastante utilizada atualmente, preconiza que as peçonhas são formadas por uma secreção produzida em um animal por uma glândula especializada e entregue ao seu alvo por meio de uma estrutura inoculadora e que contém moléculas que interrompem ou modificam os processos fisiológicos ou bioquímicos normais, de forma a facilitar a alimentação ou defesa pelo animal (Frye *et al.*, 2009, Morgenstern & King, 2013).

Por ser uma rica fonte de compostos bioativos, o estudo das peçonhas tem atraído a atenção de pesquisadores de todo mundo, principalmente por apresentarem um grande potencial farmacológico e terapêutico. Até 2002, cerca de 2.500 toxinas animais e outros produtos naturais com atividade biológica tinham sido listados (Theakston & Kamiguti, 2002), embora ainda a maior parte do arsenal presente nas peçonhas permaneça desconhecida, especialmente as neurotoxinas (Oliveira, 1997; Pimenta & Lima, 2005). Estimativas revelam um número surpreendente de compostos constituintes das peçonhas, por exemplo, aproximadamente 1000 peptídeos foram

detectados na peçonha da aranha *Hadronyche versuta* e mais de 600 peptídeos na peçonha da aranha *Atrax robustus* (para revisão ver Morgenstern & King, 2013). Vale ressaltar que a produção destas peçonhas apresenta um custo metabólico bastante elevado para o animal, e diversos autores tem descrito o uso de outras estratégias comportamentais para minimizar o uso irrestrito destas peçonhas (Morgenstern & King, 2013).

Atualmente, um grupo de animais produtores destas peçonhas, que tem despertado interesse científico, são os pertencentes ao Filo Arthropoda, principalmente pela abundância de espécies. Por exemplo, o Brasil conta com aproximadamente 20% do total de espécies do planeta e, dentre estas espécies, estima-se que 80% pertencem ao Filo Arthropoda (CDB, 2006). Além disso, este Filo é o grupo existente mais diversificado e de maior distribuição, ocupando a maioria dos nichos ecológicos. Logo, estes dados revelam o imenso potencial do estudo da peçonha de artrópodes da fauna brasileira para a descoberta de novos compostos bioativos.

Dentro deste Filo, a ordem Hymenoptera é a mais abundante, sendo formada por mais de 200.000 espécies de formigas, abelhas e vespas (Edery *et al.*, 1978; Nieves-Aldrey & Fontal-Cazalla, 1999). O nome, Hymenoptera, é derivado do grego (*hymen* = membrana; *ptera* = asas), e as espécies deste grupo apresentam dois pares de asas membranosas, sendo que as asas anteriores são maiores que as posteriores. Alguns grupos, como as formigas operárias e as vespas da família Mutilidae, perderam secundariamente as suas asas. Em relação às vespas, estas são predadoras carnívoras ou parasitas e, devido a características ecológicas e comportamentais, têm sido subdivididas em dois grandes grupos, sociais e solitárias. As vespas sociais apresentam um comportamento peculiar de defesa do ninho e tendem a atacar os

intrusos injetando sua peçonha com seguidas ferroadas, causando acidentes de envenenamento significativo (Edery *et al.*, 1978; Fitzgerald & Flood, 2006). As vespas solitárias, além da defesa, utilizam sua peçonha principalmente para a captura de presas, causando uma potente e irreversível paralisia (Piek *et al.*, 1993).

Os acidentes com vespas podem causar dor prolongada, edema, eritema local, urticária, ulcerações, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, perda dos reflexos, reações alérgicas – anafilaxia (Habermann, 1972; Edery *et al.*, 1978; Oliveira, 2000; Lorenzi, 2002; Park 2002), e suas neurotoxinas causam excitação ou depressão do Sistema Nervoso Central, produzindo sintomas como êmese, crise epiléptica, acidente vascular encefálico, torpor, paralisia sistêmica, falência respiratória e parada cardíaca (Piek *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2004). Esses sintomas são causados pelo complexo repertório de compostos presentes nessas peçonhas, como proteínas, peptídeos, aminas biogênicas, sais inorgânicos e acilpoliaminas, sendo que as proteínas são reconhecidamente compostos alergênicos (Fitzgerald & Flood, 2006).

Mesmo provocando amplos efeitos sistêmicos, a peçonha de Himenóptera é utilizada na terapia há milhares de anos. Relatos descrevem o uso para o controle de dor e inflamação no Egito e na Medicina Tradicional Chinesa (para revisão ver Chen & Lariviere, 2010). Em um recente estudo randomizado rigorosamente controlado, autores descreveram evidências clínicas da eficácia e segurança do uso da acupuntura com a peçonha de abelha (BVA) em pacientes com dor crônica (Seo *et al.*, 2013). Até o momento, o uso da BVA tem exibido diversas ações farmacológicas, incluindo efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, anti-artrite, antitumoral e contra esclerose múltipla, efeitos estes produzidos através de vários mecanismos, tais como, a ativação de sistemas neurais excitatórios e inibitórios e da modulação do sistema imune (Son *et al.*,

2007). Estes dados revelam o imenso potencial do estudo de compostos neuroativos isolados de Himenóptera para o tratamento de diversas doenças neurológicas.

## **1.2 Moléculas biologicamente ativas isoladas de vespas**

Os compostos bioativos mais estudados na peçonha de vespas são os peptídeos, com massa molecular entre 1000 – 7000 Da. Em vespas sociais, estes compostos formam 70% do peso seco da peçonha bruta (Brigatte *et al.*, 2011). Uma vez que a classificação dos peptídeos isolados da peçonha de vespas ainda não está bem estabelecida, o que tem gerado conflitos e classificações aleatórias optou-se por dividir os peptídeos de acordo com a sua atividade biológica em: quimiotáticos, mastoparanos e neuroativos.

### **1.2.1 Peptídeos Quimiotáticos**

Os peptídeos quimiotáticos de vespas (Ves-CPs) são abundantes nas peçonhas de vespas sociais e solitárias, sendo assim denominados porque induzem a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, e foram primeiramente descritos nas peçonhas das espécies *Vespa troica*, *V. mandarinia*, *V. cabro*, *V. analis*, *V. orientalis*, *V. xanthoptera*, *Paravespula lewisii* e *Icaria sp* (para revisão ver Nagashima *et al.*, 1990).

Até o momento, o peptídeo quimiotático mais estudado é Protonectina descrito da peçonha da vespa *Protonectarina sylveirae* por Dotshu e colaboradores (1993), sendo posteriormente encontrado na peçonha da vespa *Agelaia pallipes pallipes*

(Mendes *et al.*, 2004a). A sequência primária da Protonectina é ILGTILGLLKGL-NH<sub>2</sub>, com massa molecular de 1209,9 Da. Segundo Mendes e colaboradores (2004a) este peptídeo apresenta um potente efeito quimiotático e antimicrobiano, sem apresentar efeito hemolítico. Posteriormente, Murata e colaboradores (2006) descreveram o peptídeo Polistes-Protonectina da peçonha da vespa *Polistes rothneyi iwatai*, que é um análogo da Protonectina, com apenas dois resíduos de aminoácidos modificados em relação ao primeiro (Serinas nos lugares das Glicinas nas posições 3 e 11). Mais recentemente, o peptídeo Protonectina (1-6), também modificado da Protonectina, foi identificado na peçonha da vespa *Agelaia pallipes pallipes* (Baptista-Saidemberg *et al.*, 2010). Testes *in vitro* revelaram que na presença da Protonectina íntegra e da Protonectina (1,6), a ação quimiotática é diminuída, possivelmente, a interação molecular entre estes dois peptídeos adquire uma supra estrutura molecular reduzindo os efeitos quimio-atrativos causados por ambos os peptídeos separadamente (Xu *et al.*, 2006). Estes dados demonstram que os diferentes componentes presentes nas peçonhas podem interagir e produzir diferentes efeitos farmacológicos (Xu *et al.*, 2006).

Em 2005, Souza e colaboradores estudou a composição química da peçonha da vespa social *Polybia paulista*, caracterizando um novo peptídeo quimiotático, denominado Polybia-CP. Este apresentou baixa atividade hemolítica em eritrócitos de rato, além de também apresentar uma reduzida atividade de lise e degranuladora de mastócitos, como esperado para todos os peptídeos integrantes da classe Ves-CPs. Em 2006, Xu e colaboradores descreveram a estrutura de três novos Ves-CPs, denominados 5e, 5f e 5g, isolados da peçonha da vespa *Vespa magnifica*. Estruturalmente, o peptídeo 5e é igual ao peptídeo quimiotático anteriormente identificado da peçonha de *V. xanthoptera* (Yasuhara *et al.*, 1983). Estes três peptídeos

quimiotáticos isolados da peçonha de *V. magnifica* mostraram potente atividade antimicrobiana contra bactéria e fungo (Xu *et al.*, 2006).

É interessante ressaltar que mesmo apresentando sequências primárias bem próximas, a ação biológica destes peptídeos ainda precisa ser bem avaliada, uma vez que diferentes ações farmacológicas podem ser obtidas com trocas minutas de aminoácidos. Para exemplificar, Ho e colaboradores (1998) descreveram 3 peptídeos com sequência primária similar aos peptídeos quimiotáticos de vespas, HP1 (LFRLIAKTLGSLM), HP2 (LFRLANTLGKIL) e HP3 (IFGLLAKTLGNLF). No entanto, estes peptídeos apresentaram baixa atividade quimiotática em neutrófilos humanos, e se distinguiram apenas na sequência de tripeptídica das regiões amino ou carbóxi terminal, quando comparado a outros peptídeos quimiotáticos.

### **1.2.2 Peptídeos Mastoparanos**

Dentre os componentes peptídicos mais abundantes e mais estudados de peçonhas de vespas encontram-se os da classe dos mastoparanos. Esta classe é formada por peptídeos policatiônicos, anfifílicos com conformação em  $\alpha$ -hélice compostos de 10 a 14 resíduos de aminoácidos e sem nenhuma cisteína em sua sequência primária (Nakajima *et al.*, 1986; Mendes *et al.*, 2005). Possuem também resíduos de lisina que tem como possível função facilitar a liberação de histamina de mastócitos (Higashima *et al.*, 1990). Além disso, os mastoparanos ativam fosfolipase A2 (Argiolas, 1983; Rivers *et al.*, 2002), fosfolipase C (Rivers *et al.*, 2002), proteína G (Higashijima *et al.* 1988) e guanilato ciclase (Song *et al.*, 1993). Estes compostos possuem ampla e potente atividade antimicrobiana contra Gram-positivos e Gram-

negativos, sendo, provavelmente utilizados pelas vespas com a função de autodefesa e proteção de seus ninhos contra contaminação.

O primeiro mastoparano identificado e caracterizado foi descrito nos estudos de Hirai e colaboradores em 1979, na peçonha da vespa social *Vespula lewisii*. Conforme descrito para todos os mastoparanos, este peptídeo é composto principalmente por aminoácidos hidrofóbicos e lisina. A partir desta primeira descrição, inúmeros mastoparanos foram descritos da peçonha de vespas e seus mecanismos de ação têm sido bastante estudados. Experimentos realizados na década de 80 demonstraram a interação dos mastoparanos com membranas lipídicas artificiais, formadas por lectina e colesterol. Esta interação permitiria o aumento da condutância da membrana devido ao aumento da permeabilidade iônica, que por sua vez pode ser o fator determinante do efeito de liberação de mediadores da ativação celular, já que estes necessitam do elevado influxo de cálcio para promover a exocitose celular (Nakajima, 1986).

Ainda na mesma década, Higashima e colaboradores (1988) relataram a interação existente entre o mastoparano isolado da *V. lewisii* e proteínas-G, que ocorre provavelmente pela ligação da estrutura em  $\alpha$ -hélice com carga positiva do peptídeo e os fosfolipídios da membrana. Mais recentemente, Jones e Howl (2006) descobriram que os mastoparanos são capazes de ativar a resposta celular mediada por proteína G, ativando-a de maneira semelhante a um receptor metabotrópico. Segundo estes autores, os mastoparanos se posicionam na membrana celular na posição horizontal com sua face hidrofílica voltada para o meio intracelular, se ligando a proteína G, predominantemente  $G_i$  ou  $G_o$ , catalisando a troca GDP/GTP, simulando o receptor ativado (Jones & Howl, 2006). Os principais mastoparanos isolados de vespas solitária e social estão expostos na tabela 1.

**Tabela 1.** Mastoparanos encontrados em vespas

<b>Espécies de Vespas</b>	<b>Peptídeos</b>
<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	App-5 App-7 Agelaia MP-I
<i>Anoplius samariensis</i> *	Anopline
<i>Anterchium flavomarginatum micado</i> *	EMP-AF I EMP-AF 1 EMP-AF2 EMP-AF3
<i>Apoica pallens</i>	Apoica-MP
<i>Eumenes rubronotatus</i> *	EMP-ER
<i>Orancistroceros drewseni</i> *	Od-6 Od-8
<i>Oreumenes decoratus</i>	Decoralin
<i>Parapolibia indica</i>	Parapolybia-MP
<i>Polistes jadwigae</i>	Polistes MP
<i>Polistes dominulus</i>	Domilina A Dominila B
<i>Polybia paulista</i>	Polybia-MPI Polybia-MPII Polybia-MPIII Polybine I Polybine II
<i>Protonectina sylveirae</i>	Protonectina-MP
<i>Protopolybia exígua</i>	Protopolybia MPI Protopolybia MPII Protopolybia MPIII
<i>Rodopalia sp</i>	Rodopalia MP
<i>Synoeca cyanea</i>	SC-4
<i>Vespa analis</i>	Mastoparano-A
<i>Vespa basalis</i>	Mastoparano-B

Referências: Argiolas e Pisano 1984a, Chuang *et al* 1996, De Souza e Palma 2008, De Souza *et al* 2004, 2005, Dohtsu *et al* 1993, Hirai *et al* 1979a, 1979b, Ho e Hwang 1991, Ho *et al* 1998, Konno *et al* 1998, 2000, 2006, 2007; Mayo *et al* 2000, Mendes *et al* 2004, 2005, Murata *et al* 2008, Nakajima 1986, Nazimov *et al* 1980, Ribeiro *et al* 2004, Tuichibaev *et al* 1988, Turillazzi *et al* 2006, Yasuhara *et al* 1983.

### 1.2.3 Peptídeos neuroativos

Nos últimos anos, diversos compostos neuroativos foram descritos nas peçonhas de artrópodes. Estas neurotoxinas atuam no SNC e periférico e apresentam grande afinidade e especificidade a alvos envolvidos nas sinapses inibitórias e excitatórias. Estes peptídeos podem interagir com canais iônicos dependentes de voltagem para sódio, para potássio e para cálcio, ou atuar como agonistas ou antagonistas de receptores metabotrópicos (ligados à proteína G) ou ionotrópicos, como por exemplo, o receptor glutamatérgico que é predominantemente excitatório no SNC (Mellor & Usherwood, 2004; Beleboni *et al.*, 2004a; Pimenta & Lima, 2005; Mortari *et al.*, 2007a).

Devido a essas características, tornaram-se importantes ferramentas para a concepção de novas drogas no tratamento de distúrbios neuronais, como a epilepsia, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, isquemia de retina e global (Mortari *et al.*, 2007; Mortari & Cunha, 2013), bem como para o desenvolvimento de inseticidas naturais (Beleboni *et al.*, 2004, Schwartz *et al.*, 2012). Além disso, as pesquisas realizadas investigando o mecanismo de ação, a estrutura da molécula e a atividade biológica das neurotoxinas tem evidenciado que estas podem contribuir para o aprimoramento da neurociência, por exemplo, para a elucidação dos eventos relacionados às transmissões sinápticas normais e em situações patológicas (Mortari & Cunha, 2013).

Uma das primeiras neurotoxinas peptídicas descrita de vespa foi a orientotoxina, isolada da peçonha da *Vespa orientalis*. Este peptídeo foi descrito como um composto neurotóxico pré-sináptico que pode tanto bloquear quanto induzir a liberação de

neurotransmissores nos neurônios pré-sinápticos (Tuīchibaev *et al.*, 1984; para revisão ver).

A partir do final da década de 80, inúmeros peptídeos neuroativos foram identificadas da peçonha de vespas. Por exemplo, as megascoliacininas, isoladas da peçonha da vespa solitária *Megascolia flavifrons*, e as pompilidotoxinas ( $\alpha$  e  $\beta$ -PMTX) isoladas da vespa solitária *Anoplius samariensis*, que possuem uma potente ação na facilitação da transmissão neuromuscular de invertebrados (Yashuara *et al.*, 1987, Piek *et al.*, 1991, Piek 1991). As pompilidotoxinas atuam em canais para sódio voltagem-dependentes de invertebrados. No entanto, a  $\alpha$ -PMTX tem uma ação mais rápida que a  $\beta$ -PMTX. Konno e colaboradores (1998) sugeriram que a substituição da Lys por uma Arg na posição 12 poderia justificar esta diferença na atividade (Konno *et al.*, 1998). Nos neurônios trigeminiais de ratos, foi observado que a  $\beta$ -PMTX causa atenuação do processo de inativação nos canais para sódio sensíveis à tetrodotoxina (TTX) (Sahara *et al.*, 2000).

Ademais, outros peptídeos com ação no sistema nervoso foram isolados da peçonha da vespa neotropical *Agelaia vicina*: AvTx7 e 8 (Oliveira *et al.*, 2005a). O peptídeo AvTx8 atua sobre os circuitos neuronais de GABA da substância nigra, modulando as respostas de medo evocadas pelo bloqueio GABAérgico do colículo superior, causando uma potente ação antipânico (Oliveira *et al.*, 2005b). O segundo peptídeo, AvTx7, diminui a captação de L-glu de maneira não competitiva. Além disso, aumenta a liberação deste neurotransmissor, sendo este efeito inalterado na presença de bloqueadores de canais para sódio e cálcio e potencializado por bloqueadores de canais de  $K^+$ , indicando que a toxina pode agir nos canais de  $K^+$  (Pizzo *et al.*, 2004).

Ainda em relação a peptídeos neuroativos, as neurocininas isoladas de vespas estão relacionadas a distintas funções biológicas, atuando como agonistas de receptores B<sub>2</sub> metabotrópicos. Partes das sequências primárias de algumas cininas de vespas são altamente conservadas em relação à bradicinina, cuja sequência é RPPGFSPFR-OH (Nakajima, 1986), em especial, as posições 3 e 6 referentes à bradicinina são substituídas por outros resíduos de aminoácidos. As neurocininas identificadas em peçonha de vespa, assim como suas sequências primárias estão listadas na tabela 2.

Da peçonha de *Cyphononyx fulvognathus* quatro peptídeos bradicinina-like foram descobertos: treonina<sup>6</sup>-bradicinina, cifocinina, fulvonina e cd-146. Os dois primeiros promovem a contração muscular lisa e todos causam hiperalgesia quando injetados periféricamente no teste de pressão das patas de ratos, todos interagindo com alta afinidade pelos receptores de bradicinina (Konno, *et al.*, 2001a; Picolo, *et al.*, 2010). Uma das neurocininas mais comumente encontrada em peçonhas de vespas é a Treonina<sup>6</sup>-bradicinina (Thr<sup>6</sup>-BK). Um grande interesse em relação a essa classe de peptídeos é a possibilidade de desenvolvimento de novos inseticidas em decorrência de sua atividade no SNC de insetos (Piek, 1991; Schwartz *et al.*, 2012). Estudos observaram que a Thr<sup>6</sup>-BK (isolada da peçonha da vespa *Colpa ininterrupta*) impede a neurotransmissão colinérgica nicotínica de insetos (Piek *et al.*, 1990) pelo bloqueio da recaptação de colina, promovendo assim, uma paralisia irreversível neste tipo de presa (Piek *et al.*, 1991).

Em mamíferos, similar à bradicinina, quando injetada sistemicamente, as neurocininas produzem uma ativação de nociceptores, produzindo uma importante hiperalgesia e inflamação. Adicionalmente, quando injetada diretamente no SNC de

ratos, este peptídeo produziu um efeito antinociceptivo dependente de dose e tempo, apresentando uma potência 3 vezes maior que a morfina e 4 vezes maior que a bradicinina (Mortari *et al.*, 2007b). De forma singular, estudos sobre o papel das neurocininas no SNC, podem representar uma nova estratégia relacionada à dor em virtude de novos esclarecimentos sobre o sistema de controle endógeno supra espinhal (Nagy *et al.* 2007).

**Tabela 2.** Cininas encontradas em vespas

<b>Vespa</b>	<b>Peptídeo</b>	<b>Sequência primária</b>
<i>Chiphononix</i>	Thr <sup>6</sup> -Bradicinina	RPPGFTPFR
<i>Chiphononix</i>	Fulvocinina	SIVLRGKAPFR
<i>Chiphononix</i>	Cyphoscinina	DTRPPGFTPFR
<i>Polistes</i>	Polistescinina-3	PETNKKKLRGRPPGFSPFR
<i>Polistes</i>	Polistescinina-R	ARRPPGFTPFR
<i>Polistes</i>	Polistescinina-J	RRRPPGFSPFR
<i>Polistes</i>	Polistescinina-C	SKRPPGFSPFR
<i>Polistes</i>	Polistes-Protonectina	ILSALLGLLKSL
<i>Polybia</i>	Thr <sup>6</sup> -bradicinina	RPPGFTPFR
<i>Protopolybia</i>	Polybiacianina-I	DKNKKPIRVGGRRPPGFTPER
<i>Protopolybia</i>	Polybiacianina-II	DKNKKPIWMAGFPGFTPIR
<i>Vespa</i>	Vespacinina-M	GRPXGFSPFRID
<i>Vespa</i>	Vespacinina-X	ARPPGFSPFRIV
<i>Vespa</i>	Vespacinina-A	GRPPGFSPFRVI
<i>Vespa</i>	Vespacinina-T	GRPXGFSPFRVV

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

### 1.3 A vespa social *Parachartergus fraternus*

*Parachartergus* é um gênero pertencente à família Vespidae que apresenta alto grau de sinantropismo e ampla distribuição geográfica, em especial no cerrado brasileiro, tendo 17 espécies descritas até o momento (Richards, 1978; Mateus *et al.*, 2004). Um interessante comportamento de defesa é a capacidade de borrifar a peçonha na face de seus possíveis predadores (Mateus, 2005), sendo esta capaz de causar extremo ardor nos olhos. Estudos de caracterização das substâncias borrifadas e presentes no ninho da vespa eusocial e tropical *Parachartergus fraternus* indicam a presença de componentes antimicrobianos (Olson, 1995), que podem reprimir a proliferação fúngica e a predação de formigas no ninho (Jeanne, 1975).

Ainda não há um vasto conhecimento sobre os compostos presentes na peçonha de *P. fraternus*, principalmente devido à escassez de estudos sobre seus componentes. Até o momento, dois estudos foram realizados com sua peçonha: o primeiro ocorreu em 2012, por Mortari e colaboradores no qual avaliaram os efeitos tóxicos da peçonha bruta e, em 2013, Gonçalves avaliou o efeito antinociceptivo de um mastoparano isolado. Uma importante peculiaridade desta vespa é que apesar de *P. fraternus* ser uma vespa social, ela utiliza a peçonha para paralisar sua presa de forma duradoura e não-letal, além da defesa contra possíveis predadores. Interessantemente, sua peçonha quando inoculada na presa produz uma paralisia de forma irreversível, característica que até então era descrita como específica para vespas solitárias. Vespas sociais utilizam sua peçonha para a defesa contra predadores e para a captura de presas utiliza-se de suas mandíbulas. Este comportamento diferenciado sugere uma

composição diferente da peçonha e a presença de compostos neuroativos capazes de inibir o SNC de outros animais, produzindo a paralisia irreversível.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Esta pesquisa visou estudar e caracterizar os peptídeos da glândula e do reservatório da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus* com possível atividade neurobiológica.

#### 2.1.1 Objetivo específico

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- Construir uma biblioteca de cDNA a partir da glândula e reservatório de peçonha da vespa social neotropical *Parachartergus fraternus*
- Fracionar a peçonha bruta e isolar pelo menos um peptídeo neuroativo da peçonha de *P. fraternus* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antinociceptiva da Protonectina isolada;
- Modificar a sequência da Protonectina e avaliar a atividade antinociceptiva do peptídeo sintético;
- Avaliar os perfis farmacológicos da Protonectina natural e modificada por meio de curvas dose-efeito e tempo-efeito.
- Avaliar o possível efeito hemolítico do peptídeo sintético.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta das vespas e extração das peçonhas

Posteriormente à obtenção da licença de coleta e manutenção ICMBio SISBIO número 21723-1, ninhos com exemplares da vespa social *Parachartergus fraternus* foram coletados no Campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília, Distrito Federal.

A identificação da espécie coletada foi gentilmente feita pelo Prof. Dr. Fernando B. Noll do Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP. Os exemplares enviados para a identificação foram depositados na Coleção de Himenóptera da UNESP.



**Figura 1:** Na figura 1A é mostrado um ninho da vespa social neotropical *Parachartergus fraternus*, que está mostrada na figura 1B.

### 3.2 Obtenção da peçonha

Seguindo a metodologia adotada pelo grupo do Laboratório de Toxinologia - UnB, as vespas, imediatamente após a coleta, foram mantidas em temperaturas baixas (aproximadamente 4°C). Em seguida, os espécimes foram transportados para o Laboratório de Toxinologia e acondicionados a -20 °C. Uma hora após esta etapa, vinte fêmeas adultas de *P. fraternus* anestesiadas foram escolhidas e tiveram suas glândulas e reservatórios manualmente extraídos para a extração do RNA total desse material. Além disso, de todas as outras vespas foi feita a extração do reservatório e das glândulas produtoras de peçonha, após a eutanásia por congelamento (24h), e em seguida, este material foi acondicionado em tubo de 1,5 mL e mantidos a -20°C.

A partir disso, todo material foi macerado, homogeneizado em 1:1 de acetonitrila e água deionizada e centrifugado a 10.000 xg durante 3 min a temperatura de 4°C. Em seguida, para se obter a peçonha bruta, o sobrenadante foi retirado, congelado e seco a vácuo (*SpeedVac, Thermo*).

Por fim, então, a peçonha bruta foi solubilizada em 1:1 de acetonitrila e água deionizada e ultrafiltrada em um filtro Microcon (Millipore®) obtendo-se assim compostos de massa molecular < 3.000 Da, denominados compostos de baixa massa molecular (CBMM). O CBMM foi ressuspenso em água deionizada e acetonitrila (5%) para a fase de isolamento.

### **3.3 Isolamento e identificação do peptídeo**

#### **3.3.1 Isolamento dos componentes da peçonha**

Para fazer a separação dos componentes da peçonha foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no sistema Shimadzu<sup>®</sup> Prominence. Para isso usou-se uma coluna semi-preparativa de fase reversa (C18 ODS, 15  $\mu$ m, 250 X 10 mm Phenomenex<sup>®</sup>), sendo a água deionizada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% utilizado como solvente A e como solvente B, a acetonitrila com TFA 0,1%, eluição segundo o gradiente de 5% de B por 20 min, e em seguida de 5-60% de B em 40 min. Cada fração foi manualmente coletada e seca a vácuo. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm.

#### **3.3.2 Identificação das massas moleculares presentes nas frações**

Para a identificação das massas moleculares, as frações cromatográficas foram submetidas à espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Brucker Daltonics<sup>®</sup>, Alemanha). As frações já ressuspendidas em água deionizada foram adicionadas a uma matriz de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxi-cinâmico. Ao final, essa mistura foi aplicada em triplicata em uma placa Bruker MTP Massive e após a cristalização as amostras estavam prontas para a análise.

Para alcançar uma maior acurácia na obtenção dos espectros de massas (MS) variadas, o equipamento foi operado de modo refletido positivo. Já para o espectro MS/MS foi utilizado o método LIFT, para conseguir as sequências desejadas.

Foi realizado manualmente o sequenciamento de *novo* e a interpretação dos espectros obtidos e com o auxílio do software FlexAnalysis 3.0 (Brucker Daltonics®, Alemanha). Em busca de similaridades, foram utilizadas as ferramentas de bioinformática BLASTP e FASTA.

Os sequenciamentos foram realizados com o auxílio do prof. Luciano Paulino em parceria com a Embrapa - Cenargen e também pela pesquisadora Jacqueline Coimbra Gonçalves do Laboratório de Toxinologia - UnB.

Após a identificação e o sequenciamento, o peptídeo foi sintetizado pela empresa AminoTech P&D. A pureza do peptídeo sintetizado e a identificação da sequência correta foram avaliadas, utilizando a metodologia já descrita para a avaliação do peptídeo natural.

### **3.4 Transcritômica**

#### **3.4.1 Extração do RNA total**

O RNA total foi isolado com o kit ZR - Duet™ DNA/RNA Miniprep (Zymo Research), de acordo com as especificações do fabricante, utilizando, para isso, vinte exemplares (n=20) de *P. fraternus*. O volume final foi ajustado para 30 µL.

Para essa extração, os seguintes passos foram seguidos:

- I. Vinte glândulas e reservatórios de peçonhas foram retirados de fêmeas de *P. fraternus* após 1h de seus armazenamentos no freezer à -20°C;

- II. Em seguida, foi colocada em homogenizador 400  $\mu$ L de tampão de lise celular, **DNA/RNA Lysis Buffer**, ao qual foram adicionadas as glândulas e os reservatórios da peçonha. Esse material foi macerado e posteriormente transferido para um tubo eppendorf 1,5 mL e centrifugados a 10.000 rpm por 30 s;
- III. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma **Zymo-Spin™ IIC Column**, dentro do tubo de coleta (*collect tube*). Esse foi centrifugado por 1min a 12.000 X g. Nesse passo, o sobrenadante é guardado;
- IV. 0,8 volumes de etanol absoluto (100%) são adicionados ao volume do sobrenadante do passo III e misturado por pipetagem (240  $\mu$ L de etanol);
- V. As amostras do passo IV foram colocadas na coluna Zymo-Spin™ IIC Column e essa centrifugada a 12.000 X g durante 1min. Descartou-se o sobrenadante. Nessa fase, é de suma importância garantir que os materiais em uso estão livres da enzima RNase (*RNAse-free*);
- VI. 400  $\mu$ L do tampão RNA prep foram adicionados à coluna e, logo depois, centrifugada a 12.000 X g por 1min. O sobrenadante foi descartado;
- VII. Nessa etapa de lavagem, 700  $\mu$ L do tampão RNA wash foram adicionados à coluna e essa centrifugada a 12.000 X g por 30 segundos, descartando o sobrenadante. Essa etapa é repetida, apenas alterando o volume para 400  $\mu$ L;
- VIII. Centrifugou-se a coluna Zymo-Spin™ IIC, já esvaziada, que estava dentro do tubo de coleta por 2min a 12.000 X g. A seguir, a coluna foi

cuidadosamente retirada do tubo de coleta e colocada em tubo eppendorf 1,5 mL *Rnase-free*;

- IX. 30  $\mu$ L de água *RNase-free* foram adicionadas a coluna permanecendo durante 1min em temperatura ambiente. Uma centrifugação de 10.000 X g por 30 segundos foi realizada. Desses 30  $\mu$ L de RNA eluídos, 2  $\mu$ L foram retirados para quantificação no espectrofotômetro nanoview (GE Healthcare Life Sciences) e 3,5  $\mu$ L foram usados para realizar a síntese da 1ª fita de cDNA. Os 24,5  $\mu$ L restantes foram armazenados em freezer - 80°C.

#### 3.4.2 Construção da biblioteca de cDNA da peçonha de *P. fraternus*

A biblioteca de cDNA foi construída com o **kit Smarter cDNA Synthesis by LD - PCR** (Clontech®), de acordo com as especificações do fabricante, a partir do RNA total já isolado com o **kit ZR - Duet™ DNA/RNA Miniprep** (Zymo Research). Os insertos obtidos pela *Long-distance LD - PCR* foram ligados ao vetor **pSMART2IF** linearizado e transfectados em *E.coli* DH5- $\alpha$ . O DNA plasmidial foi extraído e purificado dos clones e levados para a plataforma de sequenciamento do departamento de biologia celular da Universidade de Brasília - DF.

### 3.4.2.1 Síntese da 1ª fita de cDNA

Para a síntese da 1ª fita de cDNA foi utilizado o kit **In-fusion™ Smarter™ cDNA Library Construction** (Clontech®). A partir de 3,5 µL do RNA total anteriormente isolado foi acrescentado 01 µL do **primer 3`SMART CDS IIA** na concentração 12 µM, sendo o volume total de 4,5 µL. Em seguida esse conteúdo foi misturado e gentilmente levado para uma breve centrifugada (*spin*). Após essa fase, a amostra foi levada ao termociclador (MyGenie 96 - Pioneer) a qual ficou por 3min a 72°C sendo a temperatura reduzida a 42°C por mais 2min de incubação.

Para prosseguir com a síntese da 1ª fita de cDNA é necessário acrescentar na reação 5,5 µL da seguinte mistura de reagentes:

**Quadro 1.** Reação para síntese da 1ª fita de cDNA.

<b>Material</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume</b>
<b>Tampão First-Strand</b>	5X	2,0 µL
<b>DTT</b>	100 mM	0,25 µL
<b>dNTP mix</b>	10 mM	1,0 µL
<b>Oligonucleotídeo SMARTer IIA</b>	12 µM	1,0 µL
<b>Inibidor de RNase</b>	-	0,25 µL
<b>Transcriptase reversa SMARTScribe™</b>	100 U	1,0 µL
<b>Volume final</b>	-	5,5 µL

Ao acrescentar esses reagentes, todo o conteúdo foi homogeneizado por pipetagem e levado ao termociclador para incubar a 42° por 90 min. Para finalizar a síntese da 1ª

fita, o tubo da reação foi inicialmente acondicionado em gelo e levado posteriormente para acondicionamento a -80°C, sendo que, 2 µL foram retirados para prosseguir com a síntese da 2ª fita de cDNA (*ds cDNA*).

#### 3.4.2.2 Síntese da 2ª fita de cDNA por LD - PCR (Long distance PCR)

Para a síntese da 2ª fita de cDNA (*ds cDNA*) foi feito a seguinte reação:

**Quadro 2.** Reação para a síntese da 2ª fita de cDNA.

<b>Material</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume</b>
<b>1ª fita de cDNA</b>	-	2 µL
<b>H<sub>2</sub>O deionizada</b>	-	82 µL
<b>Tampão Advantage 2 PCR</b>	10X	10 µL
<b>DNTP Mix</b>	50X	2 µL
<b>Primer 5' PCR IIA</b>	12 µM	2 µL
<b>Mix polimerase Advantage 2</b>	50X	2 µL
<b>Volume total</b>	-	100 µL

Para homogeneizar, o conteúdo foi levado ao agitador e a uma breve centrifugação foi feita para ser submetido ao seguinte programa no termociclador:

- ✓ 95°C - 1min
  
- ✓ 20 ciclos

- 95°C - 15 seg
- 65°C - 30 seg
- 68°C - 06 min
- 04°C - ∞

Uma amostra com 5 µL da reação foi aplicada em gel de agarose 1%, posteriormente corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e analisada por eletroforese.

### **3.4.3 Purificação do cDNA de “dupla-fita” e fracionamento do tamanho**

Um procedimento prévio de fracionamento no tamanho do cDNA tem sido realizado para evitar um possível viés na clonagem de grandes fragmentos. Logo, após a preparação da coluna CHROMA SPIN™ DEPC-1000 foi acrescentada a amostra de 93 µL de cDNA e seguindo os procedimentos listados:

- I. Centrifugou-se por 5 min a 700 g, o tubo de coleta e o tampão foram descartados;
- II. No segundo tubo de coleta foi colocada uma coluna, acrescentando os 93 µL da amostra na superfície da matriz do gel;
- III. Centrifugou-se novamente por 5 min a 700 g e a amostra purificada ficou no tubo de coleta;

- IV. Essa amostra purificada foi colocada em tubo eppendorf 1,5 mL para fazer a precipitação do cDNA com o etanol:
- a. Acrescentou:
    - i. 1,5 mL de glicogênio (20 µg/µL)
    - ii. 10 µL de acetato de sódio 3M (pH 4,8)
    - iii. 250 µL de etanol absoluto gelado
  - b. A amostra foi levada ao freezer -20°C durante 1h
  - c. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 min a 15°C
  - d. O sobrenadante foi removido e 100 µL de etanol 70% foram acrescentados
  - e. Para lavar o pellet, o tubo foi gentilmente agitado.
  - f. Uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 min a 15°C
  - g. Removeu-se o sobrenadante e o pellet ficou durante 10 min secando
- V. O cDNA foi ressuspendido em 15 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q dos quais 04 µL foram separados para haver a inserção no vetor de clonagem pSMART2IF

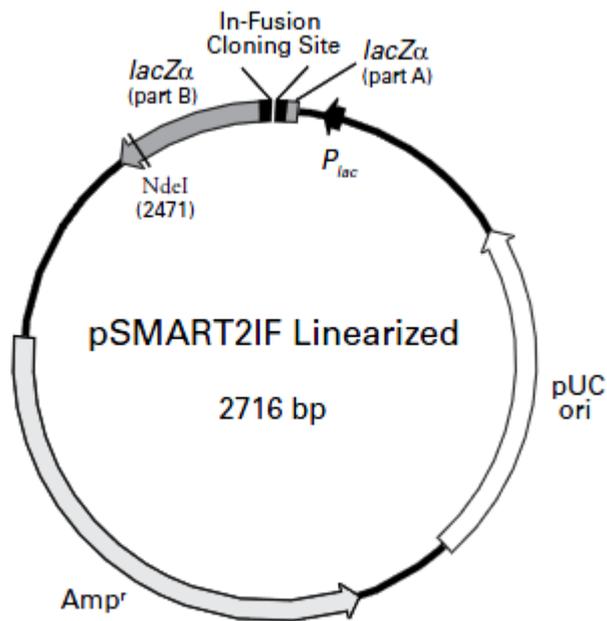
#### 3.4.4 Linhagem celular

Na etapa de clonagem, foi escolhida a linhagem celular DH5- $\alpha$  da bactéria *Escherichia coli* por ser de rápido cultivo e fácil manipulação genética.

#### 3.4.5 Plasmídeo

O vetor linear comercial utilizado foi o **pSMART2IF** (Clontech<sup>®</sup>), de aproximadamente 2,7 kb. Ambas as extremidades são “abruptas” (*blunt ends*) e possuem uma sequência de 15 pb complementares a região 5' do oligonucleotídeo SMARTer<sup>™</sup> (incluído no kit SMARTer PCR cDNA Synthesis). O sítio de clonagem In-fusion é inserida a sequência codante da enzima  $\beta$ -galactosidase (Lac-Z), sendo o promotor Lac ( $P_{LAC}$ ) responsável pela expressão. Tal peculiaridade permite a seleção de clones transformados com o plasmídeo contendo o inserto de interesse pela análise das cores, azuis e brancas.

Baseado no vetor de clonagem de *E. coli* pUC-19, este possui resistência à ampicilina ( $Amp^r$ ) e origem de replicação plasmidial pUC ori. Figura 2 mostra o mapa esquemático do vetor.



**Figura 2:** Mapa do vetor linear pSMART2IF e sítio de clonagem In-Fusion

### 3.4.6 Clonagem no vetor linear pSMART2IF

Para iniciar, a razão do DNA de *P.fraternus* e do vetor deve ser 2:1.

**Quadro 3.** Reação para clonagem no vetor linear pSMART2IF

Material	Concentração	Volume
pSMART2IF	300 ng	2 µL
DNA <i>P.fraternus</i>	600 ng	2,2 µL
In-fusion Buffer	5X	2 µL
Enzima	-	1 µL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	-	2,8 µL
Volume total	-	10 L

### 3.4.7 Oligonucleotídeos

Nesse trabalho foram utilizados oligonucleotídeos (*primers*) para iniciar as reações de PCR e para sequenciamento automático.

Os iniciadores utilizados na PCR para o sequenciamento foram os 5` e 3` pertencentes ao kit **In-fusion™ Smarter™ cDNA Library Construction**.

**Quadro 4.** Sequência dos iniciadores 5` e 3`.

Iniciador	Sequência
5`	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX-3 (X= Sequência não divulgada)
3`	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT (30)N-1N-3' (N = A, C, G, ou T; N-1 = A, G, ou C).

### 3.4.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônia

Para amplificação das sequências de interesse foram utilizados os iniciadores 5` e 3` já descritos.

**Quadro 5.** Mix da PCR de colônia

<b>Material</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume 01 reação</b>
<b>Tampão Dream Taq™ Inclui 20 mM MgCl<sub>2</sub></b>	10X	1 µL
<b>Primer 5`</b>	10 µM	0,4 µL
<b>Primer 3`</b>	10 µM	0,4 µL
<b>dNTP</b>	10 mM	0,2 µL
<b>Dream taq™ DNA polimerase</b>	5U/ µL	0,1 µL
<b>H<sub>2</sub>O Milli-Q</b>	–	*q.s.p 5 µL

\*q.s.p= quantidade suficiente para.

### **3.4.8 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep).**

(Adaptado de Azevedo *et al.*, 2003).

- 1) Inocular 1 colônia em 3 mL de meio LB em um tubo Falcon®. Deixar no agitador de tubos por 12 a 16 horas (overnight) a 37°C, 250 rpm.
- 2) Colocar 1,5 mL da suspensão bacteriana em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- 3) Centrifugar por 1 minuto a 6.000 rpm
- 4) Remover o sobrenadante
- 5) Repetir os passos 2,3 e 4 no mesmo tubo.
- 6) Ressuspender o precipitado no vortex com 200 µL da solução I. O precipitado deve estar todo diluído na solução.
  - Solução I: glicose 50mM; Tris-HCl 25 mM, pH8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0.
- 7) Adicionar 200 µL de solução II preparada na hora.
  - Solução II: NaOH 0,2 N; SDS 1%. Essa solução não pode ser colocada no gelo e o SDS deve ser o último elemento a ser adicionado.

- 8) Fechar o tubo e misturar o conteúdo vertendo 3 X.
- 9) Deixar 5 minutos no gelo.
- 10) Adicionar 200  $\mu$ L da solução III gelada
  - Solução III: 60 mL de acetato de potássio 5 M gelado; 11,5 mL de ácido acético glacial (usar o fluxo laminar), 28,5 mL de água destilada.
- 11) Fechar o tubo e misturar gentilmente batendo na parede do tubo com o dedo.
- 12) Deixar no gelo por 10 minutos.
- 13) Centrifugar 10 minutos a 15.000 rpm.
- 14) Transferir o sobrenadante para um tubo novo
- 15) Adicionar 800  $\mu$ L de etanol absoluto
- 16) Deixar 02 minutos a temperatura ambiente.
- 17) Centrifugar 10 minutos a 15.000 rpm
- 18) Remover o sobrenadante.
- 19) Adicionar 500  $\mu$ L de etanol 70%
- 20) Centrifugar 1 minutos a 15.000 rpm
- 21) Remover todo o sobrenadante com a ajuda de uma ponteira.
- 22) Secar o precipitado preferencialmente na estufa à 37oc.
- 23) Ressuspender o precipitado em 50  $\mu$ L de água Milli-Q, adicionando 1  $\mu$ L de RNase A [4 mg/mL] e deixar a 4°C por 30 minutos para facilitar a solubilização.
- 24) Estocar à - 80°C.

#### **3.4.9 Sequenciamento**

Após a minipreparação plasmidial, as amostras escolhidas e levadas para a reação de sequenciamento no Departamento de Biologia Celular da Universidade de

Brasília-DF foram aquelas que apresentavam *amplicons* com o tamanho variando entre 500pb a 1kb.

#### **3.4.10 Bioinformática**

Para a leitura do cromatograma, as sequências foram submetidas ao programa *Phred* que identifica e qualifica as sequências de bases. Sequencialmente, inicia-se a utilização do programa CAP3, que agrupa as sequências, etapa conhecida como clusterização. Posteriormente, as sequências foram comparadas pelo software BLASTX e BLASTP (sequência dos resíduos de aminoácidos obtida por meio do programa Bioedit) com sequências de himenóptera disponíveis em bancos de dados públicos.

#### **3.4.11 Análise do peptídeo sinal**

O programa SignalP 4.0 foi utilizado para a análise da presença de peptídeo sinal.

#### **3.4.12 Alinhamento das sequências**

O alinhamento das sequências da vespa social *P. fraternus* com aquelas obtidas do banco de dados foi realizado com o programa ClustalW.

## **3.5 Bioensaios**

### **3.5.1 Animais**

A manipulação dos animais experimentais ocorreu de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal - CONCEA, 2008) e com o *Guiding Principles Research Involving Animal and Human Beings* - Sociedade de Fisiologia Americana (APS, 2000). Previamente esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/IB) da Universidade de Brasília, apresentando o número de protocolo UnB Doc nº 63878/2011, cujo certificado encontra-se anexado ao final.

Camundongos Swiss (21 a 30g) foram adquiridos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. O número máximo de seis animais por gaiola foi respeitado. Todos foram mantidos no biotério e submetidos ao ciclo claro/escuro 12/12 horas, temperatura (25%) e umidade (55%) controladas.

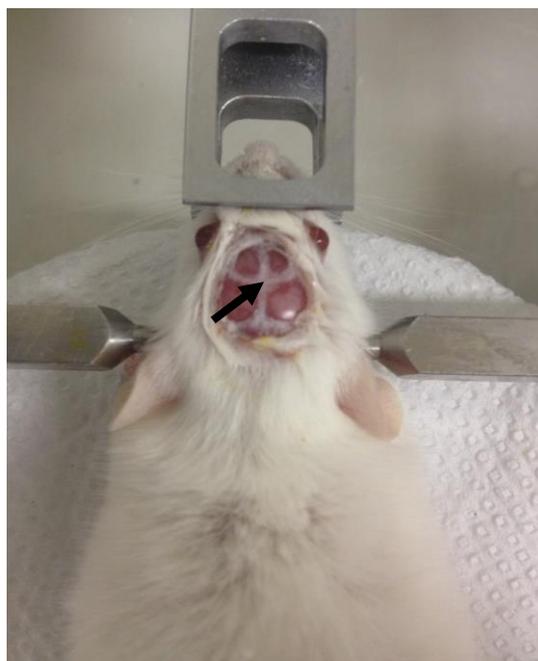
Durante todo o período experimental a alimentação e a água foram oferecidas *ad libitum*.

### **3.5.2 Implantação da cânula guia no ventrículo lateral cerebral**

Para a avaliação dos efeitos biológicos dos peptídeos, foram realizadas injeções por via intracerebroventricular, conforme detalhado a seguir. Os animais experimentais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p) com a solução de Quetamina (75 mg/kg) e Xilazina (15 mg/Kg) diluídos em salina (0,9%). Sob o efeito da anestesia, os animais foram fixados em um estereotáxico (Insight®), e realizou-se a injeção local de lidocaína

(2%). Em seguida, com o objetivo de realizar injeções intracerebrais, o crânio foi exposto para a implantação da cânula guia no ventrículo lateral cerebral (VL): AP - 0,2mm, ML 1,0mm, DV - 2,3mm, tendo como base o ponto do bregma, de acordo com o Atlas de Franklin & Paxinos (1997), como ilustrado na Figura 3.

A cânula implantada no ventrículo lateral constitui-se de um segmento de agulha hipodérmica BD-25X7 (22 G) com 10,0mm de comprimento e 0,7mm de diâmetro externo, e fixada com acrilato dental. Após a polimerização, as cânulas foram seladas com fio de aço inoxidável evitando a obstrução das mesmas. Após o procedimento foi administrada uma pomada (Nebacetin) tópica, que auxilia a cicatrização e impede infecções no local.



**Figura 3:** Ponto do bregma indicado pela seta.

Após 4-6 dias de recuperação, os animais foram submetidos aos bioensaios comportamentais. Para a avaliação de efeito antinociceptivo foi utilizado o teste da

placa quente e para a avaliação de indução de déficit motor foi usado o modelo do Rotarod.

### **3.5.3 Teste da placa quente (Hot Plate)**

Para o teste da placa quente (AVS projetos<sup>®</sup>), os animais foram colocados em um cubo de acrílico sobre uma placa quente de alumínio com temperatura de  $55 \pm 0,5$  °C. Os parâmetros de observação foram: lambidas em uma das patas traseiras e latência de fuga do aparelho (pulo). A latência de permanência máxima permitida foi de 30 s, para evitar lesão tecidual do animal.

Antes de cada neurocirurgia, os animais eram selecionados quanto à resposta ao estímulo térmico induzido pela placa quente. Caso, a resposta fosse acima de 15 s, o animal era descartado do teste.

No dia teste, os animais foram pré-avaliados e novamente, apenas os animais com latência de escape inferior a 15 s era mantido no experimento. Antes da administração dos compostos, cada animal era testado por 3 vezes com o objetivo de determinar uma linha de resposta basal, que era constituída da média de três latências de escape com intervalos de 5 min.

As injeções por via i.c.v foram realizadas por meio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus Compact Infusion Pump<sup>®</sup>), que mantinha um fluxo constante de 2  $\mu$ l/min. Após a injeção, os animais eram testados nos seguintes intervalos de tempo: 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min. Grupos independentes de animais (n=4-6, por grupo) foram tratados com veículo, morfina e os peptídeos, todos injetados por via i.c.v.

Todas as latências de respostas motoras (LA-latências de antinocicepção) foram normalizadas pelo índice de antinocicepção (IA) utilizando a fórmula:

$$IA = (LA \text{ do teste} - LA \text{ média basal}) / (LA \text{ máxima} - LA \text{ média basal})$$

Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  E.P.M. dos valores de IA e a área sob a curva (AUC -unidade computacional).

As doses utilizadas neste ensaio foram: veículo, morfina (16 nmol/animal), peptídeo natural (16 e 8 nmol/animal) e peptídeo sintético (16, 8 e 4 nmol/animal). Todas as diluições foram preparadas em veículo (água deionizada).

#### **3.5.4 Testes de déficit motor**

Para a avaliação do déficit motor provocado nos animais experimentais foi utilizado o modelo do Rotarod (Insight Equipamentos<sup>®</sup>). O equipamento consiste em uma barra cilíndrica giratória de 5 cm de diâmetro, que se move na velocidade de 20 rpm e apresenta raias de 8 cm. A duração desse experimento é de 4 dias. Nos três primeiros dias, os camundongos foram treinados a permanecer na barra cilíndrica em 5 ciclos com duração de 3 minutos cada. No quarto dia, houve um pré-teste e cada camundongo foi submetido a apenas um ciclo de 3 min. Todos os animais que permaneceram na barra cilíndrica foram utilizados na próxima etapa do bioensaio.

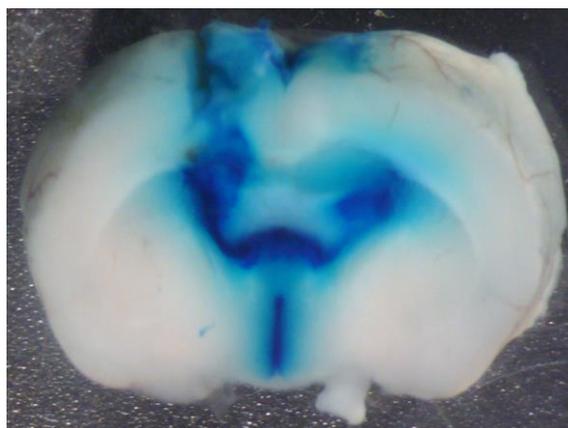
A via de administração utilizada foi i.c.v. no qual cada camundongo recebeu uma única dose do peptídeo natural (16 e 8 nmol) ou sintético (16, 8 e 4 nmol) anteriormente a suas submissões ao teste de déficit motor nos tempos de 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min. Foram registrados os tempos que os animais conseguiram permanecer no equipamento.



**Figura 4:** Modelo do Rotarod para avaliação de déficit motor

### **3.5.5 Análises macroscópicas**

Para avaliar se as cânulas foram corretamente posicionadas foi necessária uma análise macroscópica. Para isso, ao final de cada bioensaio, os animais foram levados até ao biotério para serem eutanasiados por inalação de alta concentração de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi feita uma injeção de azul de metileno (Arachemia<sup>®</sup>) pela cânula guia inserida no cérebro do animal e por fim, os cérebros foram retirados, colocados em formol 4% e mantidos a 4°C durante 24h. Posteriormente, por meio de cortes manuais utilizando como referência uma matriz de acrílico (Insight<sup>®</sup>) foi verificado o posicionamento correto da cânula guia e o local da injeção (Ventrículo corado de azul conforme ilustrado na figura 5). Foram desconsiderados os resultados dos bioensaios de todos os animais que apresentaram sua cânula posicionada incorretamente.



**Figura 5:** Análise macroscópica para visualizar o local da injeção e a posição da cânula guia no ventrículo direito com ajuda do corante azul de metileno.

### 3.6 Ensaio hemolítico

Para o ensaio hemolítico, sangue de camundongos Swiss (21-30g) foi retirado direto do ventrículo cardíaco e colocado em um tubo de 1,5 mL. Em seguida, a mistura foi centrifugada três vezes em solução salina (150 mM) por 3 minutos a 5.000 rpm para lavar os eritrócitos de componentes plasmáticos e em seguida, o sobrenadante foi desprezado. Já com a suspensão de eritrócitos (SE) a 1,5% (V/V), 50 $\mu$ L desta suspensão foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL para a realização do teste nas concentrações em triplicata de 500, 250, 83, 58, 33, 8, 0,8 mM. O controle positivo (hemólise total) foi produzido por água deionizada com o detergente Triton-X 100 a 10%, sendo que o controle negativo foi composto por solução salina (150 mM).

Após uma hora de incubação a temperatura ambiente, todo o material foi submetido a uma nova centrifugação a 5.000 rpm durante 3min e os sobrenadantes

foram retirados e colocados em uma placa de ELISA com 96 poços e a atividade hemolítica foi medida em absorbância de 540 nm.

### **3.7 Análise estatística**

Os resultados do teste de indução térmica aguda e déficit motor com distribuição normal foram submetidos ao teste de análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (*two-way ANOVA*), sendo utilizado o Bonferroni como pós-teste. As áreas sob a curva foram analisadas usando ANOVA de uma via, com  $p < 0.05$ , seguidas do teste de Tuckey.

Todos os dados foram descritos com média  $\pm$  E.P.M considerando o nível de significância com  $p < 0,05$  e as análises e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism versão 6.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Coleta e extração da peçonha

Para a obtenção das glândulas e reservatórios foram coletados dois ninhos de *Parachartergus fraternus*. Para isso, a coleta ocorreu de forma manual às 7h da manhã, horário em que há pouca atividade e a maioria dos indivíduos encontra-se no ninho. O resultado desta coleta foi um total de aproximadamente 2.500 indivíduos. Destes, foram extraídas 2.380 glândulas, resultando posteriormente aos processos de filtragem e secagem em 240 mg de compostos de baixa massa molecular (CBMM até 3.000 Da).

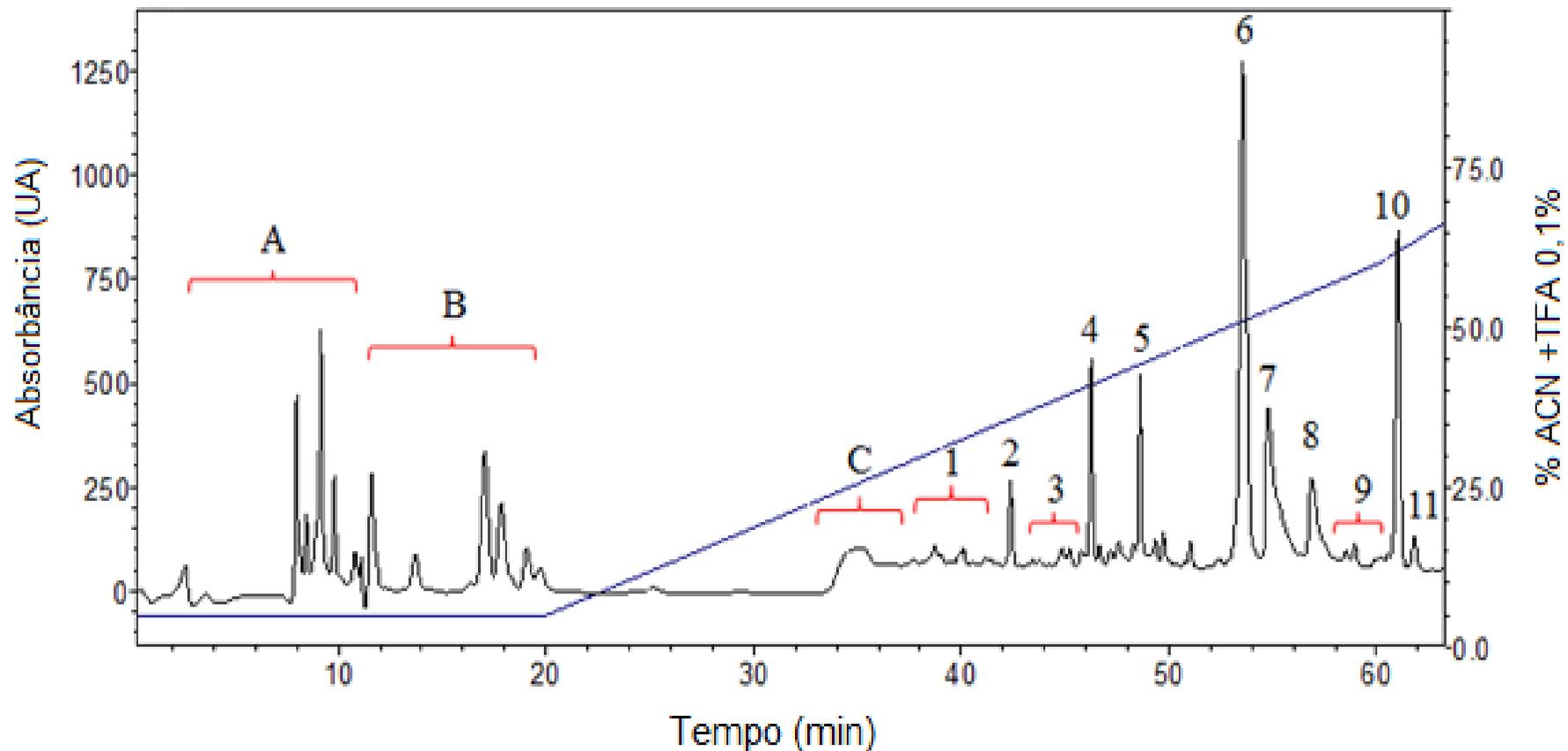
### 4.2 Fracionamento e Análise do peptídeo de *P. fraternus*

O CBMM obtido da peçonha de *P. fraternus* foi fracionado em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex Luna). O fracionamento resultou na obtenção de 11 frações peptídicas distintas (Figura 6). As frações correspondentes às letras A e B são formadas por aminas biogênicas e neurotransmissores, como GABA e glutamato.

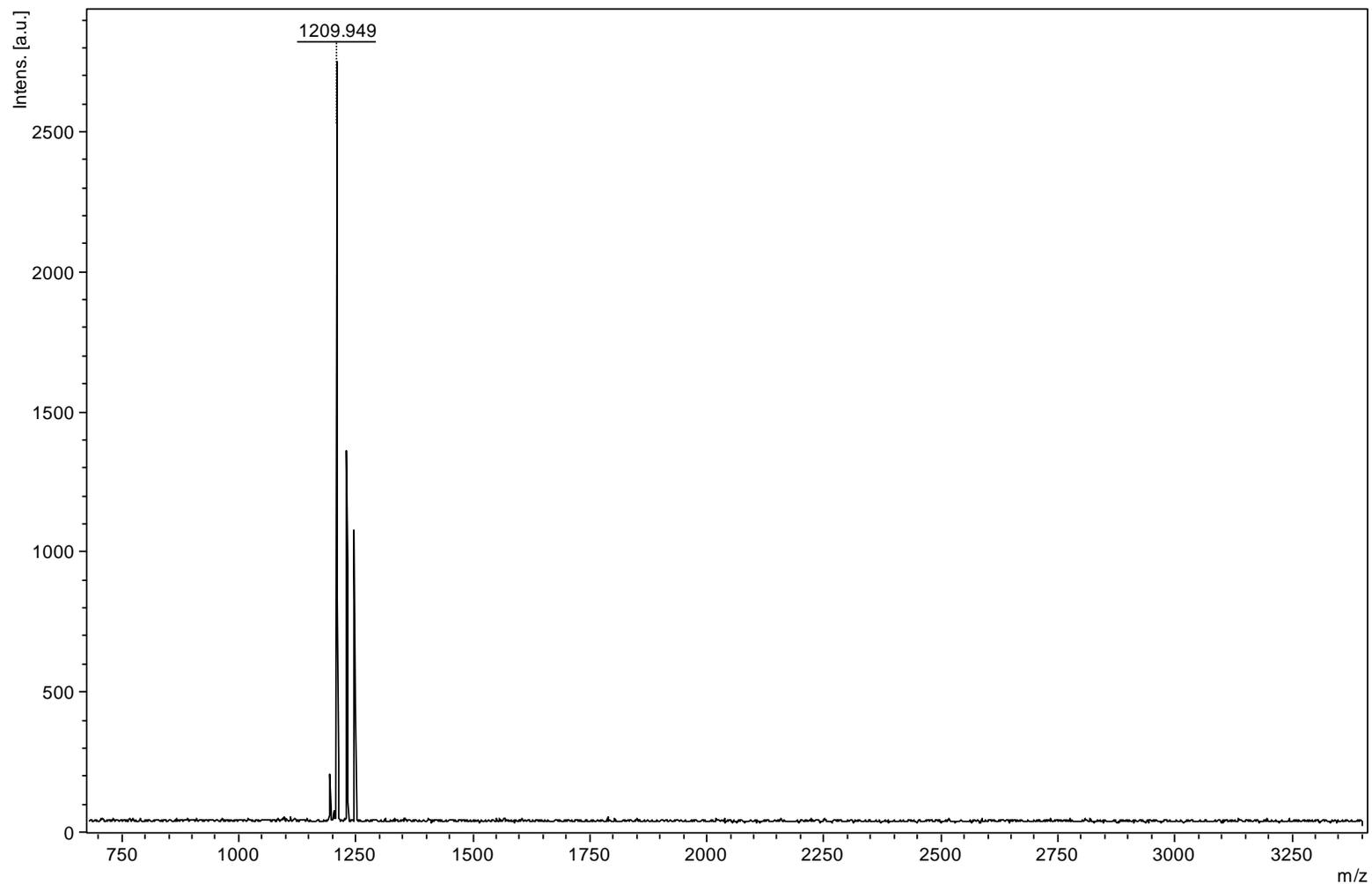
O espectro de massa (ESI-MS) da fração 9 revelou a presença de um único composto, com  $m/z$  1209.31 ( $M+H^+$ ), indicando que a fração contém um peptídeo com alto grau de pureza (Figura 7).

A identificação da sequência de aminoácidos por MS/MS conseguiu determinar parcialmente sua sequência (Figura 8). No entanto, devido à presença de ambiguidades notadamente entre Isoleucina e Leucina, não foi possível determinar

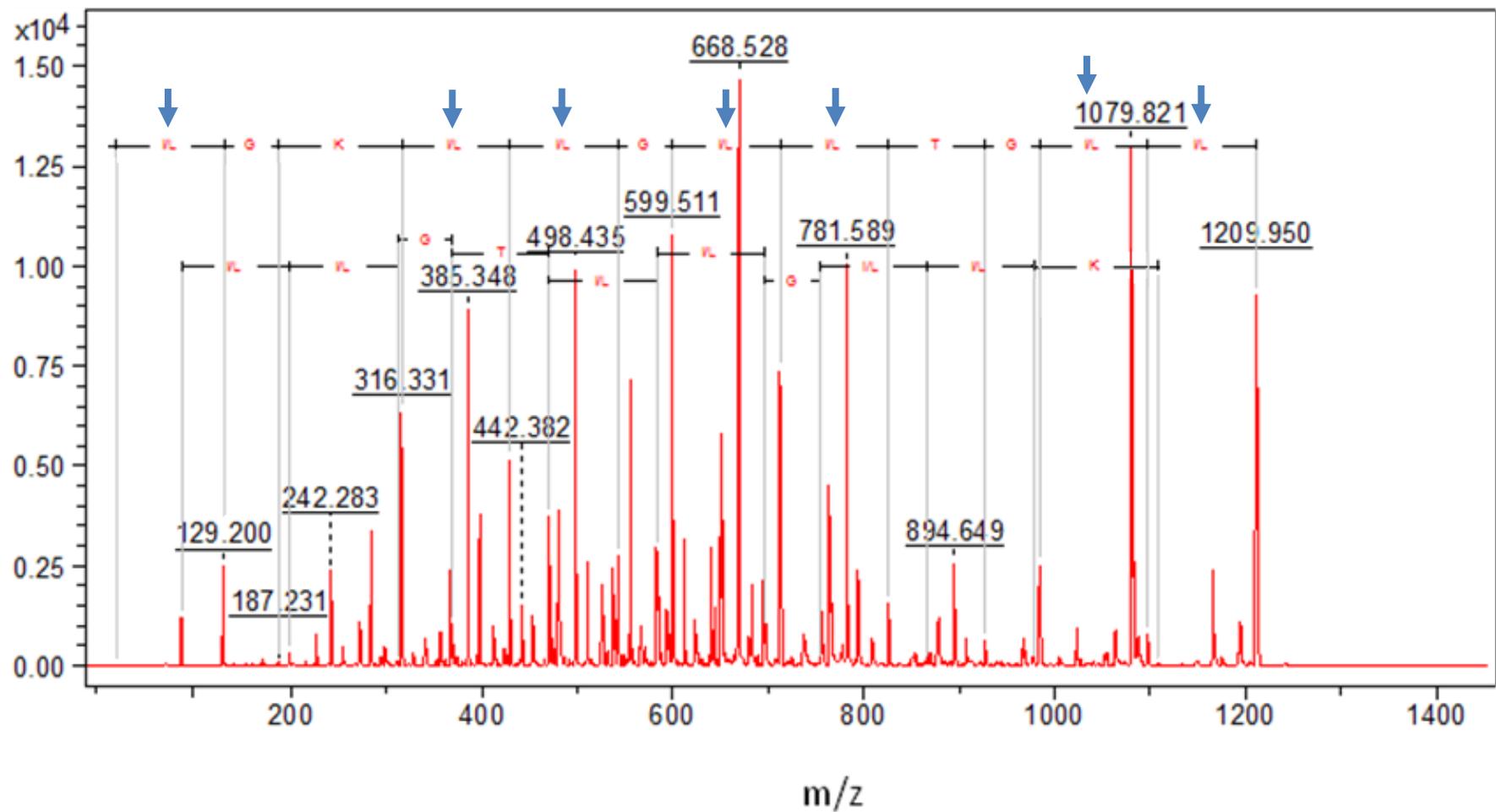
com exata precisão a composição completa dos aminoácidos do peptídeo. A sequência peptídica correspondente foi determinada como I/L-I/L-G-T-I/L-I/L-G-I/L-I/L-Q/K-G-I/L-NH<sub>2</sub>. A amidação da região terminal citada foi identificada pela perda de -17 Da nos espectros de massa e essa diferença pode ser observada nos b e y- íons obtidos na fragmentação. Além disso, os fragmentos intermediários do peptídeo auxiliaram na confirmação da sequência (por exemplo, m/z 668 - que equivale G-T-I/L-I/L-G-I/L-I/L. A fração obtida por CLAE que corresponde a este peptídeo foi liofilizada e obteve-se 0,5 mg do peptídeo, que foram mantidos em baixas temperaturas -20°C até o momento dos ensaios biológicos.



**Figura 6:** Perfil cromatográfico dos compostos de baixa massa molecular (até 3000 Da) da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18 ODS, 15 $\mu$ m, 250 x 10 mm), eluição com ACN e TFA por um gradiente isocrático de 5% ACN + TFA 0,1% (20 min), por gradiente linear de 5% até 60% de ACN + TFA 0,1% por 40 min, com um fluxo de 1,5 mL/min. As frações eluídas foram monitoradas a 216 nm. O gradiente de acetonitrila está demonstrado pela linha azul. Em cada cromatografia foram injetadas 4mg de peçonha.



**Figura 7:** O espectro de massa da fração 9 obtido pelo equipamento MALDI/TOF 57 min) revelou a presença de um único composto, contendo o íon  $(M+H^+) = 1209.9$ . Aquisição por MALDI/TOF no modo linear refletido.

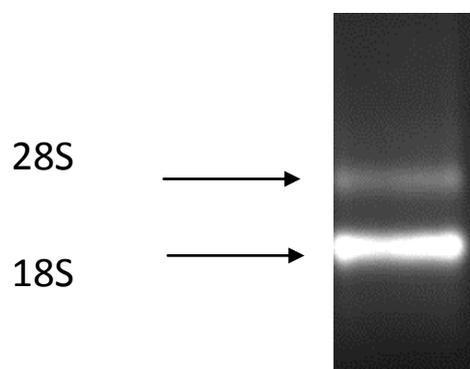


**Figura 8:** Determinação da sequência do peptídeo correspondente à fração 9 destacando-se a ambiguidade na resolução dos aminoácidos Isoleucina e Leucina. Realizado no MALDI-TOF/TOF no método LIFT.

### 4.3 Construção da Biblioteca de cDNA

#### 4.3.1 Extração do RNA total

A qualidade do RNA total extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. O indicativo de integridade ocorreu devido à presença de duas subunidades do RNA ribossomal, 28S e 18S (Figura 9). A pureza do RNA foi inferida a partir da razão das absorbâncias em 260/280 nm. Um valor próximo de 2,0 é aceito para RNA. O valor obtido no espectrofotômetro NanoVue Plus foi de 1,98.

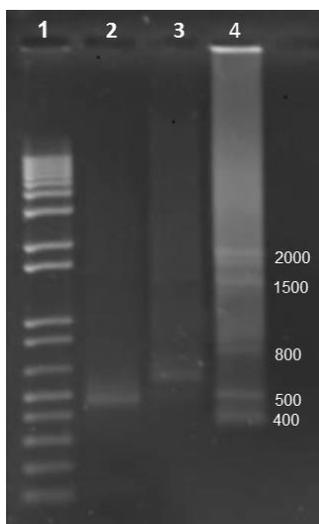


**Figura 9:** Perfil eletroforético do RNA total da glândula da peçonha da vespa social *P.fraternus*. Para essa amostra foi aplicado 254,4 ng/µL de RNA total em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL

✓ Quantificação da concentração do RNA total: 254,4 ng/ µL

#### 4.3.2 Obtenção do cDNA da glândula de peçonha da vespa social *P. fraternus*.

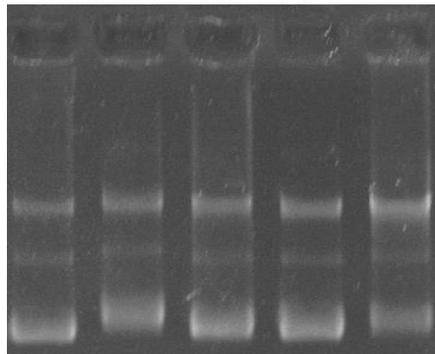
Para construir a biblioteca de cDNA da glândula da peçonha, inicialmente foi sintetizada a primeira fita de cDNA usando 2 µg de RNA total, seguindo o protocolo descrito no kit comercial. Assim, foram realizados 20 ciclos para a síntese da primeira fita de cDNA. Ulteriormente, o cDNA foi amplificado por meio de uma *long-distance* PCR (LD-PCR) e 5 µL do volume do produto dessa PCR foi aplicado para a corrida eletroforética em gel de agarose 1% posteriormente corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (Figura 10). A seguir os procedimentos de fragmentação do tamanho e purificação do cDNA são adicionados para seguir com a clonagem no vetor linearizado pSMART2IF. A figura 10 mostra o cDNA dupla fita.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 1%. Coluna 1- Marcador molecular 1kb plus (Invitrogen). Coluna 4 - Dupla fita

✓ Quantificação da purificação *ds cDNA*: 275 ng/ µL

Após o processo de transformação, os clones positivos (aqueles que tiveram a inserção do DNA exógeno na célula hospedeira) foram plaqueados em meio LB ágar + ampicilina e levados para estufa a 37°C durante 16 horas. Após esse período, foram realizadas PCRs de colônias para escolher os clones. Aqueles que apresentaram fragmentos com tamanho igual ou superior a 500 pb foram submetidos à próxima etapa de preparação de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep). Esses cDNAs foram analisados em gel de agarose 1% posteriormente corados com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (Figura 11).



**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose 1% de 5 amostras dos cDNAs da biblioteca obtido a partir da lise alcalina da biblioteca.

#### 4.3.3 Sequenciamento

Após a minipreparação plasmidial, as amostras escolhidas e levadas para a reação de sequenciamento no Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília-DF foram aquelas que apresentavam *amplicons* com o tamanho variando entre 500pb a 1kb.

#### 4.3.4 Análise de cDNA de *P. fraternus*

Uma abordagem complementar tem sido utilizada na identificação de peptídeos a partir de glândulas de veneno de Himenóptera que consiste na construção e sequenciamento de bibliotecas de EST provenientes deste tecido. Para corroborar a identificação de Protonectina identificada por MS/MS, vinte clones foram sequenciados aleatoriamente desta biblioteca. Um dos clones sequenciados mostrou alta similaridade com o cDNA correspondente ao precursor de um peptídeo isolado de *Vespa magnifica* e *Orancistrocerus drewseni* (Baek e Lee, 2010a; Yu *et al.*, 2007). A sequência desse clone possui 180 pb e a tradução *in silico* dessa sequência resulta em um peptídeo putativo de 61 resíduos de aminoácidos (Figura 12).

```
1      ATG GGG AAT CGA AAC AAC ATG AAG TTC AAT ATA GTA GCA TTT GTA
45
1      M   G   N   R   N   N   M   K   F   N   I   V   A   F   V
15

46     TTT ACA ATT ATC GCT TCA ATA GCG TGC TTG CAA TTA GCT ATT GCT
90
16     F   T   I   I   A   S   I   A   C   L   Q   L   A   I   A
30

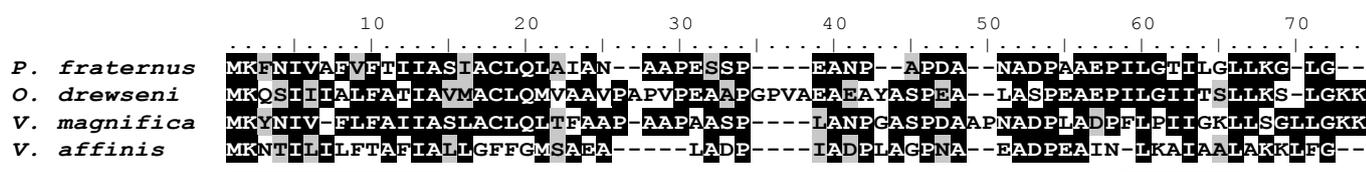
91     AAT GCA GCA CCG GAG TCC TCT CCT GAA GCA AAT CCT GCT CCT GAT
135
31     N   A   A   P   E   S   S   P   E   A   N   P   A   P   D
45

136    GCC AAT GCT GAT CCA GCA GCC GAA CCC ATT TTG GGA ACC ATC CTT
180
46     A   N   A   D   P   A   A   E   P   I   L   G   T   I   L
60

181    GGT CTT TTG AAA GGC CTT GGC TAA      204
61     G   L   L   K   G   L   G   *
```

**Figura 12:** Sequência nucleotídica e peptídica do transcrito obtido *P. fraternus*. \*= Stop codon

A análise computacional pelo software SignalP 4.1 (Peterson *et al.*, 2011) desse peptídeo mostra um sinal de clivagem entre os resíduos 26 e 27, sugerindo a presença de um peptídeo sinal. O alinhamento do precursor de *P. fraternus* com precursores de outros peptídeos identificados de *V. magnifica* e *O. drewseni*, mostra um alto grau de identidade (>75%) na região do peptídeo sinal (Figura 13). A inclusão de precursor do mastoparano proveniente de *V. affinis* no alinhamento mostra que essa região é menos conservada em relação às sequências de outros peptídeos de vespas, porém a região de clivagem é idêntica, sugerindo que esses dois precursores são clivados por mecanismos similares. Além disso, observa-se a presença de uma Glicina como último resíduo antes do stop códon, o que demonstra que pode ocorrer a amidiação por processos pós-traducionais.



**Figura 13:** Alinhamento ClustalW dos precursores de Protonectina de *Parachartergus fraternus* (*P. fraternus*), *Orancistrocerus drewseni* (*O. drewseni*), *Vespa magnifica* (*V. magnifica*) e do precursor de mastoparano de *Vespa affinis* (*V. affinis*). A região correspondente ao peptídeo sinal está sublinhada em azul e a região do peptídeo maduro está sublinhada em vermelho. Os resíduos de aminoácidos em negrito são idênticos entre as sequências, em cinza são substituições conservativas. Linhas pontilhadas foram inseridas para otimização do alinhamento

A região terminal do precursor identificado em *P. fraternus* mostra um peptídeo maduro de 13 resíduos de aminoácidos com sequência ILGTILGLLKGLG. A região



#### 4.4 Desenho e Síntese do peptídeo modificado

Pouco se sabe sobre o efeito das substituições descritas anteriormente na estrutura e atividade da Protonectina. Com esse intuito, modificações na sequência de Protonectina de *P. fraternus* foram desenhadas para a síntese química de uma Protonectina modificada. A Leucina das posições 2 e 8 foram substituídas por Fenilalanina, um aminoácido de natureza hidrofóbica com um anel aromático, . Ao contrário de Leucina, foi demonstrado que fenilalanina mostrou-se mais estável (Lehninger, 2002). As Protonectinas modificada e natural foram utilizadas em bioensaios para avaliar e comparar a atividade antinociceptiva e hemolítica desses peptídeos.

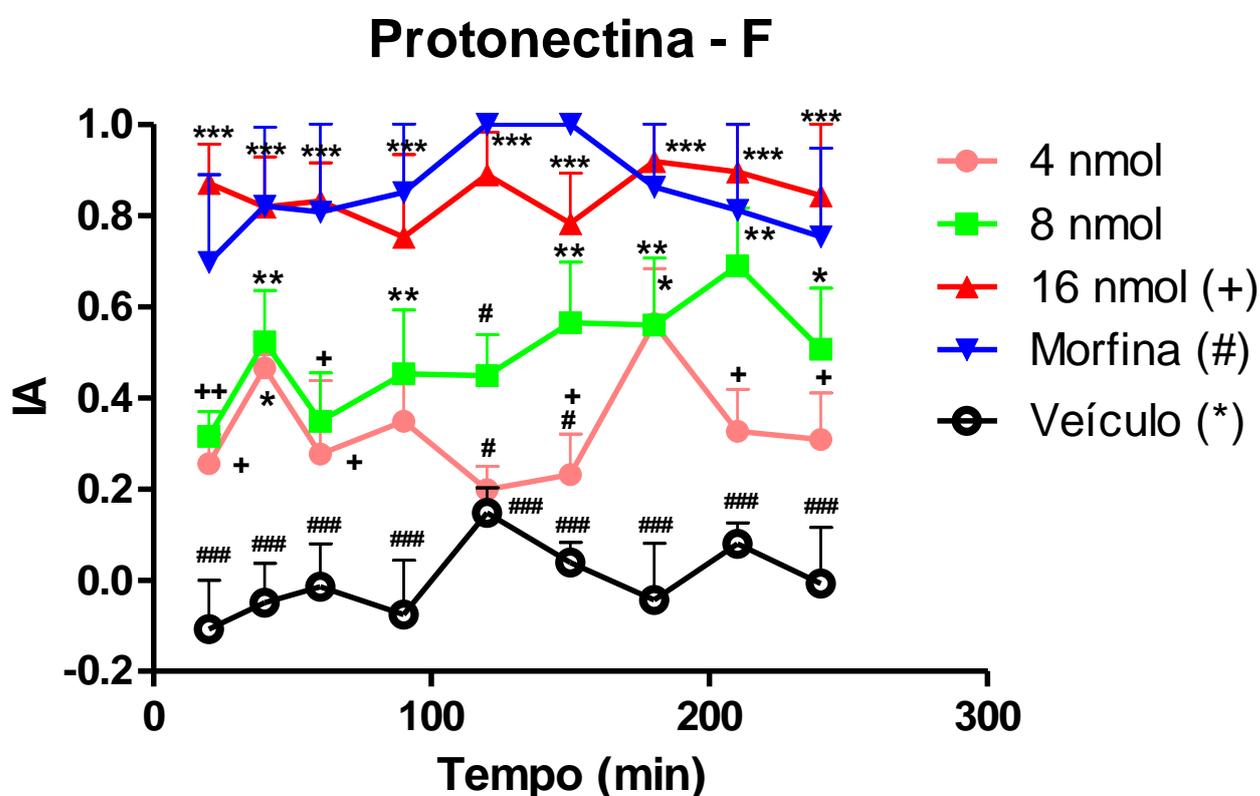
Logo, a sequência de aminoácidos do novo peptídeo é IFGTILGFLKGL -NH<sub>2</sub>. O peptídeo desenhado com modificações a partir da Protonectina encontrada na peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* foi sintetizado pela empresa Amino Tech desenvolvimento e tecnologia Ltda. Esta empresa enviou o certificado garantindo o alto grau de pureza (>99%) e a correta sequência do peptídeo. Após o recebimento, a confirmação destes dados foi feita por espectrometria de massa, utilizando os mesmos parâmetros do composto natural (Dados não mostrados).

#### **4.5 Efeito antinociceptivo da Protonectina natural e sintética em modelo de indução de dor térmica - Placa quente.**

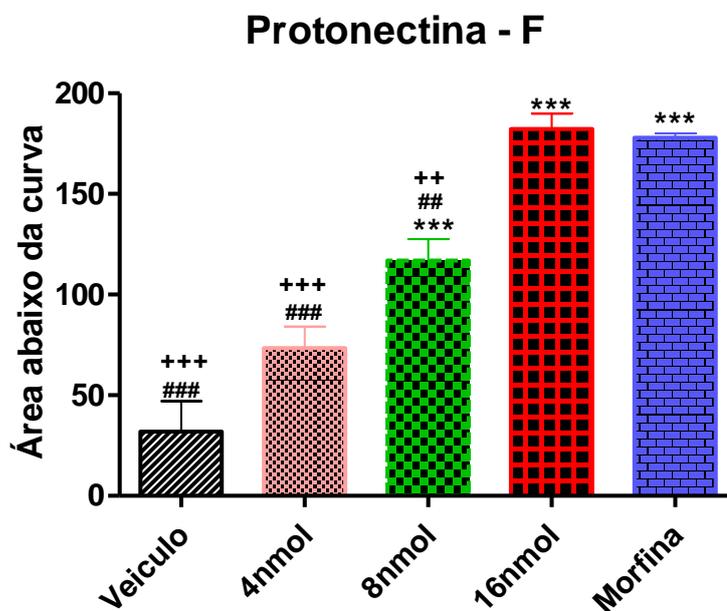
Quando injetada por via i.c.v., a Protonectina sintetizada (Protonectina - F) demonstrou um potente efeito antinociceptivo dose-dependente, em camundongos submetidos ao modelo de indução de dor térmica - placa quente. Diferenças significativas foram observadas em relação ao tratamento [ $F_{(4,18)} = 29,21$ ,  $p < 0,0001$ ], mas não foram observadas diferenças em relação ao tempo [ $F_{(8,18)} = 1,48$ ;  $p < 0,17$ ] e tempo vs. tratamento [ $F_{(32,144)} = 0,598$ ,  $p = 0,95$ ]. Em relação ao pós-teste de Bonferroni, diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) foram mostradas entre o veículo e a dose de 16nmol/animal em todos os tempos testados. Já em relação à morfina, a dose de 16nmol/animal de Protonectina-F não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 15). Essas diferenças foram confirmadas utilizando-se a área sob a curva (ANOVA seguido do pós- teste de Tukey), onde se observou um efeito antinociceptivo dose-dependente. Os efeitos causados pelo peptídeo a 16nmol/animal e a morfina não foram significativamente diferentes, enquanto que foram observadas diferenças significativas para as concentrações de 8nmol e 4nmol/animal bem como o veículo em relação à morfina e à dose de 16nmol/animal (Figura 16). Esses dados mostram que na concentração de 16nmol/animal, a Protonectina-F teve efeito antinociceptivo comparável ao da morfina (16nmol/animal).

Em relação ao peptídeo natural, quando injetado por via i.c.v. nos camundongos submetidos ao modelo de indução de dor térmica - placa quente, produziu um efeito antinociceptivo na dose de 8nmol/animal significativamente maior que o induzido pela dose de 16 nmol/animal, evidenciando a característica de não haver um efeito dependente na concentração administrada (Figura 17). Nesta dose de 8 nmol/animal,

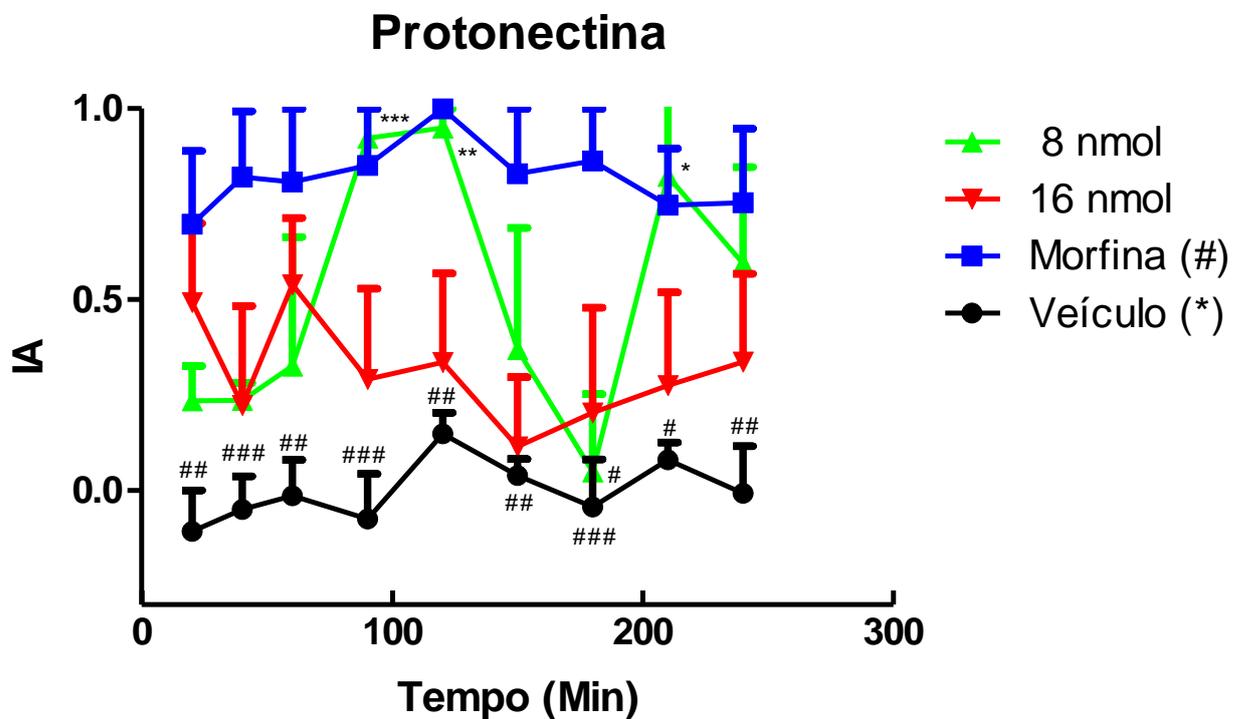
o efeito da Protonectina natural foi similar ao da morfina apenas nos tempos de 90, 120 e 240min. O teste de área sob a curva não mostrou uma diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre o veículo e Protonectina natural em nenhuma das concentrações testadas (Figura 18).



**Figura 15:** Índice de antinociceção (IA) das latências de escape da placa quente após injeção i.c.v. da Protonectina sintética (F) em camundongos. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. \* Diferenças significativas em relação ao veículo. \*\*\* =  $p<0.001$ ; \*\* =  $p<0.01$ ; \* =  $p<0.05$ . # Diferenças significativas em relação à morfina. + Diferenças significativas em relação a 16 nmol/animal. Todas as doses foram administradas em nmol por animal.

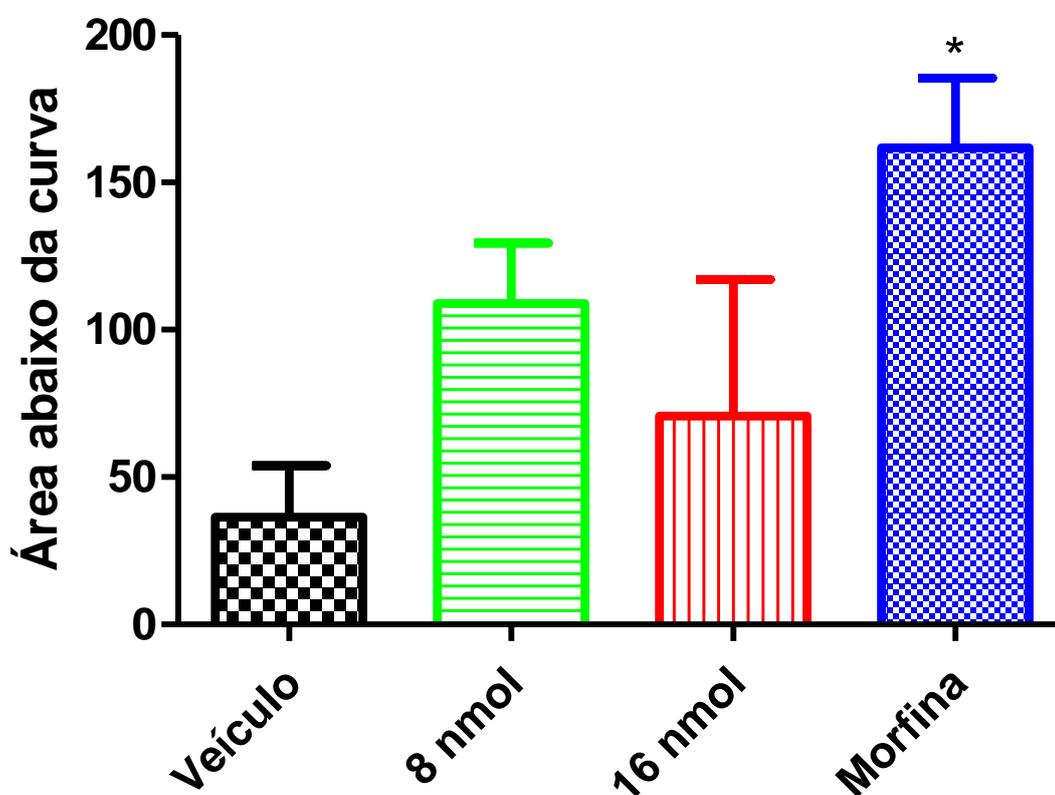


**Figura 16.** Área abaixo da curva do Índice de antinocicepção de Protonectina F da placa quente (*hot-plate*). Os dados foram submetidos ao teste estatístico Anova seguido pelo teste de Tukey. \* Diferenças significativas em relação ao veículo. \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação à morfina. + Diferenças significativas em relação à 16nmol. Todas as concentrações indicadas na figura foram expressas por animal.



**Figura 17:** Índice de antinociceção (IA) das latências de escape da placa quente após injeção i.c.v. da Protonectina natural em camundongos. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. \* Diferenças significativas em relação ao veículo. \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação à morfina. Todas as concentrações indicadas na figura foram expressas por animal.

## Protonectina



**Figura 18.** Área abaixo da curva do Índice de antinocicepção de Protonectina natural da placa quente (*hot-plate*). Os dados foram submetidos ao teste estatístico Anova seguido pelo teste de Tukey. \* Diferenças significativas em relação ao veículo.\*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação à morfina. + Diferenças significativas em relação à 16nmol. Todas as concentrações indicadas na figura foram expressas por animal.

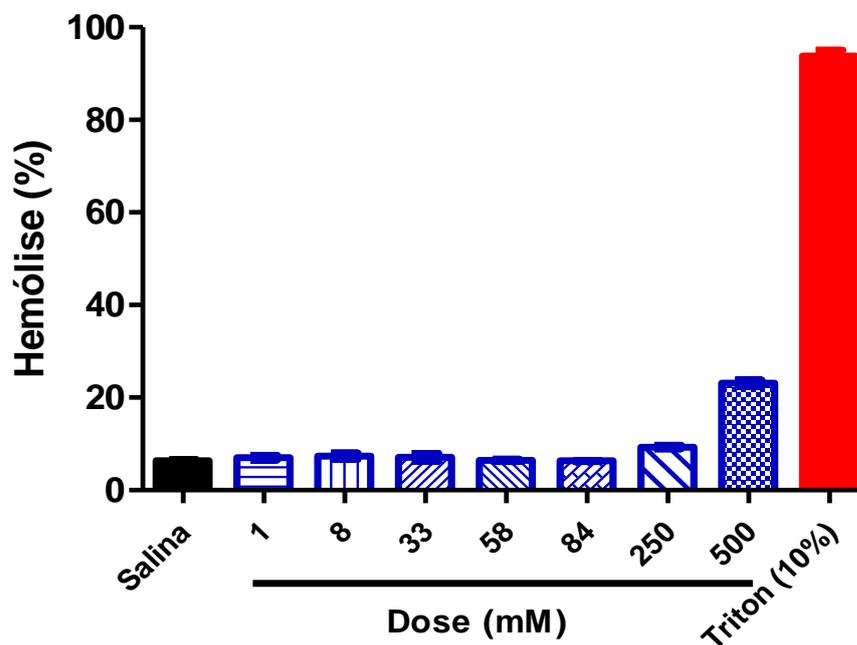
### 4.6 Ensaio hemolítico e Teste de Déficit Motor

Para avaliar os efeitos adversos dos peptídeos que poderiam interferir no desempenho no modelo do Hot-plate, a Protonectina-F e natural foram submetidas ao ensaio hemolítico e ao teste de déficit motor no Rotarod. O ensaio hemolítico com a

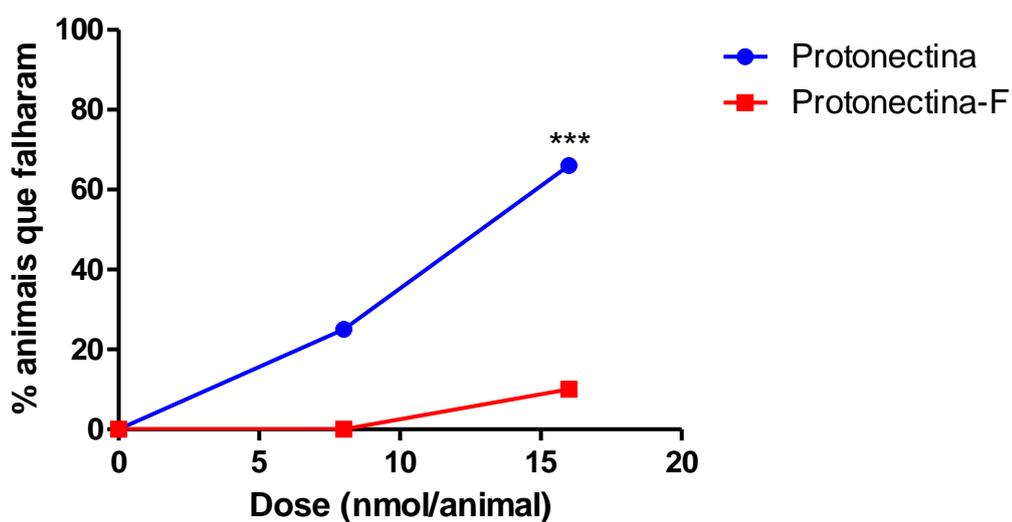
Protonectina-F não mostrou atividade hemolítica significativa nas concentrações de 0,83 a 250 mM, tendo apresentado um aumento da porcentagem de hemólise de 23,14% na concentração de 500 mM (Figura 19). Estudos anteriores já haviam mostrado que a Protonectina natural isolada da peçonha de *A. pallipes pallipes*, com sequência idêntica à Protonectina natural de *P. fraternus*, não apresentou atividade hemolítica (Mendes *et al.*, 2004b). Portanto, esse ensaio não foi realizado para a Protonectina natural de *P. fraternus*.

O ensaio de déficit motor conduzido em Rotarod mostrou uma diferença significativa entre a Protonectina natural e sintética (teste exato de Fischer,  $p < 0,0001$ ). Enquanto que mais de 60% dos camundongos injetados com 16nmol/animal de Protonectina natural falhou no teste, na mesma concentração de Protonectina-F, apenas 10% caíram (Figura 20).

## Protonectina - F



**Figura 19:** Ensaio hemolítico usando diferentes concentrações da Protonectina - F. Neg. - controle negativo (Salina 0,9%), Pos - controle positivo (Triton X-100 10%).



**Figura 20:** Ensaio de déficit motor em Rotarod usando diferentes concentrações de Protonectina e Protonectina - F.

## 5. DISCUSSÃO

Predominantemente, a caracterização de compostos isolados de peçonhas (peptídeos) tem seguido uma estratégia proteômica, contando especialmente com a espectrometria de massa. Essa estratégia apresenta várias vantagens, como sensibilidade, detecção de peptídeos maduros, isoformas, entre outras (Goecks *et al.*, 2013). No entanto, a sequência determinada por MS/MS do peptídeo isolado no presente trabalho mostrou que 2/3 dos aminoácidos apresentavam ambiguidades quanto à definição de aminoácidos hidrofóbicos, impossibilitando identificar completamente sua sequência apenas com esta técnica. Ademais, abordagens proteômica não permitem a identificação dos genes que codificam peptídeos da peçonha. Neste cenário, a utilização de estratégias que incluem tanto a identificação de sequências peptídicas como sequências nucleotídicas é uma poderosa ferramenta para estudar a peçonha de vespas (Goecks *et al.*, 2013).

Um método eficiente para se obter um perfil da composição e diversidade dos peptídeos presentes nas glândulas da peçonha de artrópodes é a construção de bibliotecas de cDNA (Azevedo *et al.*, 2009). A análise de sequências expressas ocorre pela geração de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), obtidos a partir do sequenciamento aleatório de clones da biblioteca de cDNA. As sequências parciais da molécula de DNA complementar são obtidas a partir do RNA poli A<sup>+</sup>. Essa técnica fornece amostras representativas da variabilidade gênica expressa no sistema em estudo (Lee *et al.*, 1995), nesse caso, a glândula de peçonha. Neste trabalho, a estratégia de sequenciamento de ESTs provenientes da glândula da peçonha de *P. fraternus* conjuntamente com o fracionamento e posterior sequenciamento de

peptídeos por espectrometria de massa permitiu a identificação do peptídeo Protonectina, sendo que a obtenção do cDNA correspondente ao precursor permitiu resolver as ambiguidades na sequência obtida por espectrometria de massa. Portanto, a utilização de estratégias de proteômica e transcritômica mostrou-se complementar e relevante para uma caracterização mais completa dos genes e da composição peptídica das peçonhas de *P. fraternus*.

Segundo Azevedo e colaboradores (2009), o impacto da ciência transcritômica na toxilogia tem aumentado, não apenas para o estudo da peçonha de vertebrados (serpentes), mas também no estudo de toxinas por animais invertebrados. Além disso, estes autores ressaltam que o uso de estratégias complementares, como a análise proteômica e transcritômica, possibilitam uma maior acurácia e obtenção de toda a diversidade de toxinas. Isto pode facilitar o estudo de toxinas e o entendimento da fisiopatologia do envenenamento em humanos e o desenho de novas moléculas farmacêuticas (Azevedo *et al.*, 2009).

Após análise de bancos de dados, observou-se que a sequência obtida por este estudo é idêntica ao peptídeo primeiramente descrito de *Protonectarina sylveirae* (Dohtsu *et al.*, 1993) e também do peptídeo de *Agelaia pallipes pallipes* (Mendes *et al.*, 2004), sendo ambas as vespas sociais.

Formas alternativas do peptídeo Protonectina foram detectadas em *A. pallipes pallipes* e *O. drewseni* (Baek & Lee, 2010; Baptista-Saidemberg *et al.*, 2010). Em *A. pallipes pallipes* um hexapeptídeo correspondente aos seis primeiros resíduos da Protonectina madura foi detectado por espectrometria de massa. Esse peptídeo, denominado Protonectina (1-6) não parece ser produto da clivagem do peptídeo maduro, uma vez que foi detectado na presença de inibidores de

proteases. Protonectina e Protonectina (1-6) formam uma estrutura supramolecular heterodimérica com atividade biológica alterada em relação aos peptídeos separadamente (Baptista-Saidemberg *et al.*, 2010). Em *O. drewseni*, além da Protonectina contendo doze resíduos de aminoácidos, uma forma alternativa foi detectada contendo dois aminoácidos amino-terminais adicionais, resultando em um peptídeo de 14 resíduos. A presença desses dois resíduos na região amino-terminal aboliu a atividade anti-bactericida, preservando a atividade antifúngica (Baek & Lee, 2010). Segundo esses autores esses resultados sugerem que essas formas alternativas podem ser resultado de um processamento alternativo de um único precursor de mRNA correspondente à Protonectina e podem ter um papel biológico na composição peptídica da peçonha. Portanto, a caracterização dos genes que codificam os precursores é importante para compreensão e detecção de formas alternativas de peptídeos presentes na peçonha de vespas.

Em relação à peçonha de vespas, até o momento, mesmo considerando o grande potencial desta estratégia, são raros os estudos da composição da peçonha a partir da construção de bibliotecas de cDNA. Uma exceção é a pesquisa realizada com a vespa *Vespa magnifica* que tem sido bastante estudada e há um razoável conhecimento da composição de sua peçonha e de sua biblioteca de cDNA. Componentes peptídicos como mastoparano, peptídeos quimiotáticos de vespas e anticoagulantes, além de seus precursores já foram identificados para esta vespa (Yue *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). O precursor identificado neste trabalho apresentou similaridades como encontrado na biblioteca da vespa solitária *Orancistrocerus drewseni*, sendo que o peptídeo putativo maduro apresentava diferenças (ver figura 13 e 14) (Baek & Lee, 2010a).

A vespa social *Parachartergus fraternus* tem um comportamento bastante peculiar com relação à utilização de sua peçonha. Ao invés de utilizar a peçonha apenas para a proteção do ninho ou autodefesa, a vespa *P. fraternus* utiliza sua peçonha para a paralisia de suas presas, similar às vespas solitárias. A capacidade de paralisar a presa provocada por alguns animais invertebrados após o envenenamento tem indicado a presença de potentes peptídeos neuroativos com atividades inibitórias. Como exemplo dessa relação entre paralisia provocada após o envenenamento e a presença na peçonha de compostos neuroativos destaca-se o desenvolvimento do composto ziconotide, comercializado com o nome Prialt. Este composto foi isolado do caracol *Conus magnus*, que paralisa suas presas antes de envolvê-las e hoje é utilizado como potente analgésico contra dor crônica quando administrado via intratecal (diretamente na medula espinhal) (Skov *et al.*, 2007). Portanto, o estudo da composição e efeito dos componentes da peçonha é importante para estabelecer uma relação entre a composição e o comportamento social e solitário. Além disso, pode revelar moléculas de relevância farmacológica com atividade neurobiológica.

Apesar de ter sido identificada em várias espécies de vespas sociais, pouco se sabe sobre a atividade neurobiológica das Protonectinas. Estas são peptídeos quimiotáticos de natureza anfipática cujas atividades antimicrobianas e de degranulação de mastócitos já foram caracterizadas. Este trabalho representa a primeira descrição de atividade neurobiológica destes peptídeos, mais especificamente relacionada à antinocicepção.

No teste de estímulo térmico (placa quente), a Protonectina natural purificada de *P. fraternus* demonstrou um maior efeito antinociceptivo na concentração de 8nmol/animal quando comparado com a concentração de 16nmol/animal. Ao mesmo

tempo, os animais submetidos ao modelo do Rotarod mostraram maior déficit motor na concentração de 16nmol/animal em relação à concentração de 8nmol/animal. Estes resultados sugerem que a alta concentração (16nmol/animal) de Protonectina pode ter um efeito neurotóxico, provocando perda do efeito antinociceptivo por uma indução de déficit motor. No modelo de estimulação térmica testada no Hot-plate é imprescindível à avaliação de alteração na coordenação motora pelo composto avaliado, uma vez que os animais podem ter seus valores de latência alterados pela indução de déficits motores, o que pode ser registrado como antinocicepção. Esta alteração pode produzir efeitos falsos-positivos neste modelo.

É importante ressaltar que curvas dose e resposta em forma de U invertido são comumente encontradas para fármacos neuroativos, isto se deve ao fato que estes compostos em altas concentrações produzem efeitos adversos comuns aos compostos neuroativos, que no resultante causam a descoordenação motora. Nestes casos, é preciso considerar que a emissão de comportamentos adaptativos resulta de funcionamento ótimo do SNC, que é necessariamente perturbado por doses elevadas de qualquer substância neuroativa. Logo, a curva representada em baixas concentrações segue uma sigmóide característica de curvas dose e respostas em testes *in vitro*, mas em altas concentrações o efeito vai regredindo até ser totalmente ofuscado pelos efeitos neurotóxicos (descoordenação motora) (Graeff & Guimarães, 2012). Neste trabalho, observou-se que altas doses do peptídeo natural induziram alterações causando a queda dos animais da barra do Rotarod e, além disso, também induziu uma redução vertiginosa do efeito antinociceptivo produzido pelo peptídeo natural. Devido à quantidade restrita obtida do peptídeo para todos os testes, a curva completa com pelo menos 3 concentrações do peptídeo natural não pode ser realizada,

mesmo assim pode-se constatar um efeito antinociceptivo na dose de 8 nmol/animal e na dose maior, um efeito reduzido.

A substituição de duas Leucinas, nas posições 2 e 8, por Fenilalanina alterou a atividade biológica do peptídeo. A Protonectina sintética mostrou ter uma atividade antinociceptiva mais eficiente do que o peptídeo natural e em níveis comparáveis ao da morfina durante todo o período de teste. Além desse aumento na eficiência do efeito antinociceptivo, observou-se que o peptídeo sintético, na dose testada, não induziu deficiência motora grave nos animais testados no modelo Rotarod, ao contrário do peptídeo natural. Os resultados obtidos com a Protonectina sintética mostram que além da detecção de peptídeos naturais a partir de peçonhas de vespas, alterações na sequência destes peptídeos podem ser realizadas e a síntese de novos peptídeos podem gerar diversidade e compostos com atividades farmacológicas mais eficientes. Neste caso, a substituição de Leucina por Fenilalanina, um aminoácido que demonstrou maior estabilidade, gerando resultados superiores quando injetados no Sistema Nervoso Central.

Para a comparação da eficiência e potência do peptídeo sintético, foi utilizado o principal fármaco analgésico utilizado na clínica terapêutica, a morfina. Este fármaco atua em receptores opióides e como outros opióides, há uma grande desvantagem de seu uso, por provocar dependência química, tolerância e déficit motor. Nos testes comparativos com a Protonectina sintética, esta se mostrou equivalente na atividade antinociceptiva. Estes resultados sugerem que a Protonectina sintética pode ser um candidato para o desenvolvimento de uma nova droga analgésica.

Existe um grande interesse da indústria farmacêutica de desenvolver novas drogas e terapias contra a dor. A liberação comercial de Prialt, isolado de um

invertebrado, tem estimulado a prospecção de peçonhas de outros grupos de animais. Novos peptídeos isolados das cobras *Dendroaspis polylepis* e *Ophiophagus hannah* mostraram potencial contra dor comparáveis ou superiores ao da morfina sem a mesma toxicidade e estão em fase de testes pré-clínicos (From Toxins to theurapeutics, The Scientist). Em fases de estudos iniciais, peptídeos com atividade antinociceptiva já foram isolados de vespas, como a Treonina<sup>6</sup>-bradicina e um mastoparano, isolados de *Polybia paulista* e *P. fraternus*, respectivamente. Estes exemplos evidenciam o grande potencial de compostos isolados de peçonhas animais e enfatizam a necessidade de pesquisas e investimentos continuados para a identificação de novos fármacos. Devido à ampla diversidade na composição de peçonhas, ao mesmo tempo levando em consideração a biodiversidade brasileira, é possível afirmar que a prospecção de peçonhas está apenas no início, com um potencial de descoberta bastante promissor.

## 6. Conclusões

- ✓ O uso de técnicas de proteômica e transcrito-seq se mostraram eficientes e complementares para a detecção de peptídeos da vespa social *P. fraternus*.
- ✓ O peptídeo isolado de *P. fraternus* é idêntico à Protonectina isolada da vespa *Protonectarina sylveriae*;
- ✓ O peptídeo natural apresentou um efeito antinociceptivo, mas induziu também déficits motores na maior dose testada;
- ✓ A modificação introduzida (Protonectina-F) no peptídeo mostrou um potente efeito antinociceptivo dose-dependente;
- ✓ Na concentração de 16 nmol/animal, a Protonectina-F não mostrou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação à morfina;
- ✓ Protonectina-F não apresentou Déficit Motor no modelo Rotarod;
- ✓ A Protonectina-F não mostrou atividade hemolítica significativa;
- ✓ A Protonectina-F de *P. fraternus* pode ser uma interessante ferramenta neurofarmacológica antinociceptiva.

## 7. Referências bibliográficas

Argiolas A, Pisano JJ (1983). Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J Biol Chem*, 258:13697–702. 41

Argiolas A, Pisano JJ (1984). 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.

Azevedo, M. O; Felipe, M. S. S; Brígido, M. M.; Maranhão, A. Q.; De-Souza, M. T (2003). Técnicas básicas em Biologia Molecular. Editora UnB, Brasília, Brasil.

Baek JH, Lee SH (2010a). Isolation and molecular cloning of venom peptides from *Orancistrocerus drewseni* (Hymenoptera: Eumenidae). *Toxicon* 55: 711-718.

Baek JH, Lee SH (2010b). Differential gene expression profiles in the venom gland/sac of *Eumenes pomiformis* (Hymenoptera: Eumenidae). *Toxicon* 55: 1147-1156.

Baptista-Saidemberg NB, Saidemberg DM, Souza BM, César-Tognoli LMM, Ferreira VMR, Mendes MA, Cabrera MPS, Neto JR, Palma MS (2010). Protonectin(1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon* 56: 880-889.

Baptista-Saidemberg, NB (2011). Análise peptidômica dos venenos de vespas sociais neotropicais. Programa de pós-graduação em ciências biológicas (biologia celular e molecular). Rio Claro.

Beleboni RO; Pizzo, AB; Fontana, ACK; Carolino, ROG; Coutinho-Netto, J; Santos, WF (2004a). Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur J Pharmacol* 493(1-3):1-17.

Beleboni, RO; Carolino, ROG; Pizzo, AB; Baldan, LC; Coutinho-Netto, J; Santos, WF; Coimbra, NC (2004b). Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cell Mol Neurobiol* 24, 707–728.

Brigatte P, Cury Y, Souza BM, Baptista-Saidemberg NB, Saidemberg DM, Gutierrez VP, Palma MS (2011) Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectina sylveirae*). *Amino acids* 40: 101-111.

Bockmann S, Paegelow I (2000). Kinins and kinins receptors: importance for the activation of leukocytes. *J Leukocyte Biol.* 68:587–92.

Butignol CA (1992). Observações sobre a bionomia da vespa predadora *Polista versicolor* (Olivier, 1791) (Hymenoptera: Vespidae) em Florianópolis/SC. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 21(2): 113 – 123 42

Cabrera MPS, Costa STB, Souza BM, Palma MS, Ruggiero JR, Neto JR (2008) Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide *Polybia-MPI*. *Eur Biophys J* 37: 879-891.

Cascone O, Amaral V, Ferrara P, Vita N, Guillemot JC, Díaz LE (1995) Purification and characterization of two forms of antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom. *Toxicon* 33 (5): 659-665.

CDB- Convenção sobre Diversidade Biológica (2006). Ministério das Relações Exteriores/ Ministério do Meio Ambiente. <http://www.cdb.gov.br>

Chai ZF, Bai ZT, Liu T, Pang XY, Ji YH (2006). The binding of bmk it2 on mammal and insect sodium channels by surface plasmon resonance assay. *Pharmacol res* 54: 85–90.

Chen, DM, Lee, PT, Chou, KJ, Fang, HC, Chung, HM, Chen, DM, Chang, LK, (2004). Descending aortic thrombosis and cerebral infarction after massive wasp stings. *Am. J. Med.* 116 (8), 567–569

Chen J, Laviere WR (2010). The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy- A double-edged. *Progress in Neurobiology* 92: 151-183.

Chen W, Yang X, Yang X, Zhai L, Lu Z, Liu J, *et al* (2008). Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius. *Peptides*, 29:1887–92.

Cobea. (1991). Princípios Éticos na Experimentação Animal. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/Cobea, <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>

Costa, MH (1994). Derivação da Fonte de Sinais EEG: Correlação e Mapeamento Cerebral. Rio de Janeiro. Tese (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Programa de Engenharia Biomédica, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Cunha AO, Mortari MR, Oliveira L, Carolino RO, Coutinho-Netto J, dos Santos WF (2005). Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141 (1): 50-7.

Dohtsu K *et al.*, (1993). Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectina sylveirae* (Himenoptera – Vespidae). *Natural Toxins*, New York,1:271-6.

Ebert U, Löscher W (1995). Strong induction of c-fos in the piriform cortex during focal seizures from different limbic nuclei. *Brain Res* 671:338-344.

Ederly H, Ishay J, Gitter S, Joshua H (1978). In: BETTINI, S. Venoms of Vespidae. *Arthropod venoms*. New York: Springer-Verlag, p.691-771.

Engel, J (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42:796:803.

Fitzgerald KT, Flood AA (2006). Hymenoptera Stings. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 21:194-204.

Fisher, PD; Sperber EF; Moshé SL (1998). Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev.* 20(8):563-73.

Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D.A., King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J.A., Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C., de la Vega, R.C., (2009). The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 10, 483–511

- Gallucci Neto, J., Marchetti, R. L. (2005). Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia / Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy. *Rev bras psiquiatr* 27(4):323-328.
- Geddes LA, Baker LE (1989). Principles of Applied Biomedical Instrumentation. Third Ed. New York: Wiley-Interscience.
- Graeff, FG, Guimarães, FS. Fundamentos de Psicofarmacologia. Editora Atheneu. 2ª edição.
- Guimarães SS (1999). Psicologia da Saúde e doenças crônicas. In: Kerbauy RR, ed. Comportamento e saúde: explorando alternativas. São Paulo: ARBytes: 22-45.
- Gobbi, N; Machado VLL (1984). Material capturado e Rev. bras. occidentalis. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 13(1): 63-69.
- Gobbi, N (1984). Contribuição ao estudo do ciclo básico de espécies do gênero *Polybia*, com especial referência a *Polybia* (*Myrapetra*) *paulista* (Ihering, 1896) e *Polybia occidentalis occidentalis* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). *Revta bras. Entomol.*, 28(4):451-457.
- Goldensohn ES (1997). Historical Perspective, em: Engel Jr J, Pedley TA - Epilepsy: a Comprehensive Textbook, Philadelphia, Lippincott-Raven, 15-16.
- Guyton A. C (1976). Tratado de Fisiologia Médica. 5a. Ed. Rio de Janeiro: Interamericana.
- Habermann E (1972) Bee and wasp venoms. *Science, Washington*, 117:314-22.
- Hancock R, Diamond G (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in host defenses. *TIMS, Providence*, 8:402-410.
- Harvey JA, McMaster SE, Romano AG (1993). Methylenedioxyamphetamine: neurotoxic effects on serotonergic projections to brainstem nuclei in the rat. *Brain Res* 619(1-2):1-14.
- Higashijima T, Uzu S, Nakajima T, Ross EM (1988). Mastoparan a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem*;263:6491-4. 44

- Higashima M, Sawada S, Yamamoto C (1990). Applicability of Pascal distribution to quantal analysis for non-stationary release of neurotransmitter. *Neurosci Lett*. 1990 Jul 31;115(2-3):231-6.
- Himi T, Saito H, Kawai N, Nakajima, T (1990). Spider toxin (JSTX-3) inhibits the convulsions induced by glutamate agonists. *J Neural Transm Gen Sect* 80(2): 95-104.
- Hirai Y, Yasuhara T, Yoshida H, Nakajima T (1979). A new mast cell degranulation peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem Pharm Bull*, Tokyo, 27(8):1942-1944.
- Hirai Y *et al.*, (1979b). A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*) *Chem Pharm Bull* 27:1945-1946.
- Ho CH; Hwang LL (1991). Local edema induced by the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom and its components. *Toxicon* 29(8):1033-42.
- Ho CL, Chen WC, Lin YL (1998). Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. *Toxicon*, Elmstford, 36(4):609-17.
- Hoffman DR (1993) Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 92 (5): 707-716.
- Jackson H, Parks TN. (1990). Anticonvulsant action of an arylamine-containing fraction from *Agelenopsis* spider venom. *Brain Res* 526(2): 338-341.
- Jeanne, R. L. (1975). The adaptiveness of social wasp nest architecture. *The quarterly review of Biology*, 50: 267-2.
- Jones, S. e Howl, J. (2006). Biological Applications of the Receptor Mimetic Peptide Mastoparan. *Current Protein and Peptide Science*, v. 7, 501-508.
- King, G.F. (2011). Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 11, 1469–1484

Kishimura, H *et al.*, (1976). Vespakinin-M, a novel bradikynin analogue containing hydroxyl-proline, in the venom of *Vespa mandarinia* Smith. *Chem Pharm Bull*, 24: 2896-2897.

Kolarich D, Léonard R, Hemmer W, Altmann F (2005) The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *FEBS J* 272 (20): 5182-5190.

Konno K *et al.* (1998) Isolations and structure of pompilodoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, 250:612-616.

Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Kawai N(2000). 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.

Konno k *et al.* (2001a). Isolation and sequence determination of peptides in the venom of the spider wasp *Cyphononyx dorsalis* guided by matrix-assisted laser desorption/ionization time of light (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Toxicon* 39: 1257-1260.

Konno K, Palma MS, Hitara IY, Juliano MA, Juliano L, Yasuhara T (2002). Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. *Toxicon* 40: 309–312.

Konno K *et al.* (2006). Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides*, 27, 11: 2624-2631. 45

Konno, Katsuhiko, et al. "Decoralin, a novel linear cationic  $\alpha$ -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*." *Peptides* 28.12 (2007): 2320-2327.

Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ (2001). The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther* 90 (1): 21-34.

LaRoche SM, Helmers SL (2004b). The new antiepileptic drugs: clinical applications, *JAMA* 291 (5): 615-20.

Lawson, FR *et al.* (1961). Studies of an integrated control system for hornworms on tobacco. *J. Econ. Entomol.*, 54(1): 93 - 97.

Nelson DL, Cox MM (2002). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5<sup>th</sup> edition.

Li ML, Liao RW, Qiu JW, Wang ZJ, Wu TM (2000). Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. *Int J Antimicrob Agents*;13:203–8.

Lorenzi, C. C. B (2002). 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.

Löscher W (1998). New visions in the pharmacology of anticonvulsion. *Eur J Pharmacol* 342: 1-13.

Löscher W, Ebert U. (1996). The role of the piriform cortex in kindling. *Prog Neurobiol* 50: 427-481.

Machado VLL (1977). Estudos Biológicos de *Polybia occidentalis occidentalis* (Olivier, 1791) (Hymenoptera -Vespidae). *An. Soc. Entomol. Brasil*, 6(1):3-6.

Machado VLL; Gobbi N; Simões D (1987). Material coletado e utilizado na alimentação de *Stelopolybia pallipes* (Olivier, 1791) (Hymenoptera - Vespidae). *An. Soc. Entomol. Brasil*. 16(1): 73-79.

Maranhão, MVM *et al.*, (2011). Epilepsia e anestesia. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 61 (2).

Mateus, S. (2005). Análises dos comportamentos envolvidos na organização social e no processo de enxameio de *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera, Polistinae, Epiponini). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto-SP

Mayo KH *et al.*, (2000). Structure-function relationships in novel peptide dodecamers with broad-spectrum bactericidal and endotoxin-neutralizing activities. *Biochem. J.* 349: 717–728.

McEwen K (2001). Making waves: what Mary Glover taught us! *Axone*; 23(2):8-12.

McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS (2006). Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE*, 356.

- Meldrum, B. (1997). Identification and preclinical testing of novel antiepileptic compounds. *Epilepsia* 38(suppl.9):s7-s15.
- Mellor IR, Usherwood PNR (2004). Targeting ionotropic receptors with polyamine containing toxins. *Toxicon* 43: 493-508.
- Mendes MA, Souza BM, Marques MR, Palma MS (2004) Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon* 44: 67-74. 46
- Mendes MA, Souza BM, Palma MS (2005) Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon* 45 (1): 101-106.
- Mendes MA, Palma MS (2006). Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Peptides*, New York, 27:2632-2639.
- Monteiro MC, Romão PRT, Soares AM (2009) Pharmacological Perspectives of Wasp Venom. *Protein & Peptide Letters* 16: 944-952.
- Morgenstern D & King, GF (2013). The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon* 63: 120-128
- Mortari MR, Cunha AO, de Oliveira L, Vieira EB, Gelfuso EA, Coutinho-Netto J, Ferreira dos Santos W (2005) Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97 (5): 289-95.
- Mortari MR, Cunha AO, Ferreira LB, dos Santos WF (2007) Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. *Pharmacol Ther* 114 (2): 171-83.
- Mortari MR, Cunha AOS, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, Tomaz JC, Lopes NP *et al.*, (2007b). Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. *Br J Pharmacol* 151(6): 860–869.

Mortari, MR (2007). Atividade neurobiological e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. Tese, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Mortari MR, Cunha AOS (2013). New Perspectives in Drug Discovery Using Neuroactive Molecules From the Venom of Arthropods. *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*. Chapter 4.

Murata K *et al.*, (2006). Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. *Biol Pharm Bull*, Tokyo, 29(12):2493-2497.

Murata K *et al.*, (2009). Novel mastoparan and protonectin analogs isolated from a solitary wasp, *Orancistrocerus drewseni drewseni*. *Amino Acids* 37:389-394.

Nagy I. *et al.*, (2007). Taking the sting out of pain. *British Journal of Pharmacology*, 151 (6): 721-722.

Nagashima K *et al.*, (1990). Role of lysine residue at 7th position of wasp chemotactic peptides. *Biochem. and Bioph. Research Commun.*, Orlando, 168:844-849.

Nakajima T *et al.*, (1985). Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. *Peptides*. Suppl 3:425-30.

Nakajima T *et al.*, (1986). Amphiphilic peptides in wasp venom. *Biopolymers*, New York, 25:115-21. 47.

Nakajima, T (1986). In: *Venoms of the Hymenoptera: Pharmacology and Biochemistry of Vespide Venoms*; Piek, T. Editor, Academic Press: London; pp. 309–327.

Nazimov i V, Snezhkova LG, Miroshnikov AT (1980). Structure and properties of mastoparan II. Na oligopeptide from the venom of *Vespa orientalis* hornet. *Proc. 3d Symp. Chem. Pept. Prot.*: USSR.

Nencioni AL, Lebrun I, Dorce VA (2004). A microdialysis study of glutamate concentration in the hippocampus of rats after TsTX toxin injection and blockade of

toxin effects by glutamate receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(2):455-63.

Nieves-Aldrey, J. L. & Fontal-Cazalla, F. M. (1999). Filogenia y Evolución del orden Hymenoptera. *Boletín de la Sociedade Entomologica Aragonesa (SEA)*, 26: 459-474.

O, donnell, S; Jeanne RL (1990). Forager specialization and the control of nest repair in *Polybia occidentalis* Olivier (Hymenoptera: Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol*, 27:359-366

Olivera BM. (1997). Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 8(11):2101-9.

Oliveira MR, Palma MS (1998) Polybitoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). *Toxicon* 36 (1): 189-199.

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

Oliveira L, Cunha AO, Mortari MR, Dos Santos WF (2006). Cataleptic activity of the denatured venom of the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 30(2):198-203.

Oliveira L, Cunha AOS, Mortari MR, Pizzo AB, Miranda A, Coimbra NC, Santos WF (2005a). Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigroreticular pathways. *Brain Research* 1031:74-78.

Oliveira L, Cunha AOS, Mortari MR, Coimbra NC, Santos WF (2005b). Cataleptic Activity of the denatured venom of the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Progress in Neuro-Psychopharmacologic & Biological Psychiatry*, 30(2):198-203.

Olson, EJ (1995). *Parachartergus fraternus* (Gribodo) (Hymenoptera: vespidae: polistinae) uses venom when taking caterpillar prey. *Psyche* 103:85-93.

- Park NG, Yamato Y, Lee S, Sugihara G (1995). Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. *Biopolymers*, New York, 36:793-801.
- Park R (2002). Bee and Hymenoptera stings. *Emedicine* 3(1). ([www.emedicine.com](http://www.emedicine.com)).
- Palma MS (2006). Insect venom peptides. In: Kastin A, editor. *Handbook of biologically active peptides*. San Diego: Academic Press; 409–17.
- Parkinson, N.M., Smith, I., Weaver, R., Edwards, J.P., 2001. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 57–63.
- Piccolo G *et al.*, (2010). Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. *Biochem Pharmacol* 79(3):478-86.
- Piek T, Hue B, Mantel P, Nakajima T, Pelhate M, Yasuhara T (1990). Threonine6-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS. *Comp Biochem Physiol C* 96(1):157-62.
- Piek T (1991). Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon* 1991;29:139–49.
- Piek T (1984). Pharmacology of hymenoptera venom. In: Tu AD, editor. *Handbook of Natural Toxins*. Vol 2. Marcel Dekker; New York, USA. pp. 135–185
- Piek T, Hue B, Le Corrionc H, Mantel P, Gobbo M, Rocchi R (1993). Presynaptic block of transmission in the insect CNS by mono- and di-galactosyl analogues of vespulakinin 1, a wasp (*Paravespula maculifrons*) venom neurotoxin. *Comp Biochem Physiol C*. 105(2):189-96.
- Pimenta, AMC, Lima ME (2005). Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J Pept Sci* 11 (11): 670-6.
- Pinel, JP; Rovner, LI (1978). Experimental epileptogenesis: Kindling-induced epilepsy in rats. *Experimental Neurology*, 58, 190-202.

- Pirpignani, ML; Rivera E; Hellman U; Bonino MBJ (2002) Structural and immunological aspects of *Polybia scutellaris* Antigen 5. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407: 224-230. 48
- Pisano JJ (1968). Vasoactive peptides in venoms. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bethesda, 27:58-62.
- Pizzo AB, Belebony RO, Andréia CK, Fontana ACK, Ribeiro AM, Miranda A, Coutinho-Netto J, Dos Santos, WF (2004). Characterization of the action of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *J Biochem Mol Toxicol*, New York, 18(2):61-68.
- Prezoto E; Machado VLL (1999). Ação de *Polistes* (Aphanilopterus) simillimus Zikán (Hymenoptera, Vespidae) no controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). *Revta bras. Zool.* 16(3):841-850;
- Poblet, J. M (1988). *Introducción a la Bioingeniería*. Barcelona: Marcombo-Boixareu Editores.
- Rabb RL; Lawson FR (1957). Some factors influencing the predation of *Polistes* Wasp on the tobacco hornworm, *J. Econ. Entomol.*, 50(6): 778-784.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (3): 281-94.
- Raza, M, Shaheen, F, Choudhary, MI, Sombati, S, Rafiq, A, Suria, A, Rahman, AU & DeLorenzo, RJ (2001). Anticonvulsant activities of ethanolic extract and aqueous fraction isolated from *Delphinium denudatum*. *J Ethnopharmacology* 78: 73-78.
- Ribeiro SP (2004). Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 25(12):2069-2078.
- Ribeiro SP, Mendes MA, Santos LD, Souza BM, Marques MR, Azevedo Jr WF, Palma MS (2004) Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 25 (12): 2069-2078.

Richards, OW (1978). The social wasps of the Americas (excluding the Vespinae). London, British Museum (Natural History). 580p.

Richards OW; Richards MJ (1951). Observations on the social wasps of South America (Hymenoptera, Vespidae). *Trans. Entomol. Soc. London*, 102: 1-170

Rivers DB, Rocco MM, Frayha AR (2002). Venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* increases Na<sup>+</sup> influx and activates phospholipase C and phospholipase A2 dependent signal transduction pathways in cultured insect cells. *Toxicon*, 40:9–21.

Rocha; Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-273.

Rogawski MA; Donevan SD (1999). AMPA receptors in epilepsy and as target for antiepileptic drugs. *Adv Neurol.* 79:947-963. 49

Sahara Y, Gotoh M, Konno K, Miwa A, Tsubokava H, Robinson HP, Kawain (2000). A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current. Oxford, *Eur J Neurosci*, 12(6):1961-70.

Saidemberg DM, Silva-Filho LC, Cesar Tognoli LMM, Tormena CF, Palma MS (2010). Polybioside, a Neuroactive Compound from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. *J Nat Prod* 73 (4): 527-531.

Sander JW (2003). The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol*, 16:165-70.

Sandoval MR, Lebrun I (2003). TsTx toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom induces spontaneous recurrent seizures and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 44: 904–911.

Santos G. M *et al.*,(1997) . Capacidade de vôo de *Polybia occidentalis occidentalis* (Olivier, 1791) (Hymenoptera Vespidae). Resumos. XI Encontro de Zoologia do Nordeste, pág. 36.

Santos LD, Santos KS, Arcuri HA, Cunha Neto E, Kalil JE, Castro FM, Palma MS (2007) Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1

from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). *Toxicon* 50: 923-937.

Santos LD, Santos KS, Pinto JRA, Dias NB, Souza BM, Santos MF, Perales J, Domont GB, Castro FM, Kalil JE, Palma MS (2010) Profiling the Proteome of the Venom from the Social Wasp *Polybia paulista*: A Clue to Understand the Envenoming Mechanism. *Journal of proteome research* 9: 3867-3877.

Seo BK, Lee JH, Sung WS, Song EM, Jo DJ (2013). Bee venom acupuncture for the treatment of chronic low back pain- study protocol for a randomized, double-blinded, sham controlled trial. *Trials* 14:16

Skov MJ; Beck JC; de Kater AW; Shopp GM (2007). Nonclinical safety of ziconotide: an intrathecal analgesic of a new pharmaceutical class. *Int. J. Toxicol.* **26** (5): 411–21.

Soldatova L, Kochoumian L, King TP (1993) Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. *FEBS Lett* 320 (2): 145-149.

Spradbery JP (1973). Wasps. An account of the biology and natural history of social and solitary wasps. Seattle, University Washington Press, 408.

Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT: Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007, 115:246–270

Song DL, Chang GD, Ho CL, Chang CH (1993). Structural requirements of mastoparan for activation of membrane-bound guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*; 247:283–8.

Souza BM (2002). Peptídeos policatiônicas do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Polistinae): estrutura e função. 2002.120 f. (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Souza BM, Marques MR, Tomazela DM, Eberlin MN, Mendes MA, Palma MS (2004) Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 1095-1102.

Souza BM, Mendes MA, Santos LD, Marques MR, César LM, Almeida RN, Pagnocca FC, Konno K, Palma MS (2005) Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 26 (11): 2157-2164.

Souza BM; Palma, MS (2008). Monitoring the positioning of short polycationic peptides in model lipid bilayers by combining hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry *Biochem. Biophys. Acta (BBA)*, 1778, 12: 2797-2805.

Souza BM, Palma, MS (2009). Peptides From Hymenoptera Venoms: Biochemistry, pharmacology and potential applications in health and biotechnology. In: De Lima ME, Pimenta AMC, Martin-Euclaire MF, Zingali RB, Organizers. *Animal Toxins: The State of Art. Perspectives on Health and Biotechnology*; Belo Horizonte, Brazil: Editora UFMG, 273–297.

Souza BM, Silva AVR, Resende VMF, Arcuri HA, Cabrera MPS, Neto JR, Palma MS (2009) Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 30: 1387- 1395. 50

Theakston RD, Kamiguti AS (2002) A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon* 40 (5): 579-651.

Tuichibaev, MU, Akhmedova, NU, Kazako, I, Korneev, A. S, Gagel`Gans, AI (1988). Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*. Structure and function. *Biokhimiia*. 53(2):219-26.

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

Turillazzi S *et al.*, (2006). Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom* 17:376-83.

Ueno Y *et al.*, (1977). On the Kinin-like substances in the venom of paper wasp. *Proc. 97th Ann. Meeting Pharmaceutical Soc. Japan* III, 37.

Udenfriend S, Nakajima T, Pisano JJ (1967). Structure of the major kinin in wasp (*Polistes*) venom. *Proc. 7th Int. cong. Biochem.* VIII (4):501.

Villetti, G, Bregola, G, Bassani, F, Bergamaschi, M, Rondelli, I, Pietra, C, Simonato, M. (2001). Preclinical evaluation of CHF3381 as a novel antiepileptic agent. *Neuropharmacology*. 40: 866-878

Xu X, Li J, Lu Q, Yang H, Zhang Y, Lai R (2006). Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. *Toxicon*, Elmsford, 47:249-253.

Watanabe M, Yasuhara T, Nakajima T (1976). Occurrence of thr6-bradikinin and its analogous peptide in the venom of *Polistes Rothneyi iwatai*. *Animal, Plant and Microbial Toxins*, II, 105-112.

Yasuhara, T, Mantel, P, Nakajima, T, Piek, T (1987). Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp *Megascolia flavifrons*. *Toxicon* 25, 527–535.

Yasuhara T, Yoshida, H, nakajima, T (1977). Chemical investigation of the hornet (*Vespa xanthoptera* Cameron) venom. The structure of a new bradikinin analogu “Vespakinin-X”. *Chem Pharm Bull*, 25:935-941.

Yasuhara T, Nakajima t, Erspamer V (1983). Isolation and sequence analysis of peptides in the picomolar level. In: SAKAKIBARA, S. (Ed.), Osaka: Protein Research Foundation, 213-218.



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 25 de julho de 2011.



## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA DE COMPOSTOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS”**, UnBDOC n.º 63878/2011, sob responsabilidade da Profa. Márcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



  
Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA

