

DELANO ANIBAL DA SILVA

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PEÇONHAS DE
VESPA (*Polistes lani o lanio*) E FORMIGA
(*Paraponera clavata*)**

CAMPINAS

2011

DELANOANIBAL DA SILVA

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PEÇONHAS DE
VESPA (*Polistes lanio lanio*) E FORMIGA
(*Paraponera clavata*)**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Stephen Hyslop

CAMPINAS

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

Si38a Silva, Delano Aníbal da
Atividades biológicas de peçonhas de vespa (*Polistes lanio lanio*) e formiga (*Paraponera clavata*). / Delano Aníbal da Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Stephen Hyslop
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Toxinas. 2. Citotóxicas. 3. Veneno. 4. Vespa-veneno. 5. Neurotoxinas. 6. Vespa. I. Hyslop, Stephen. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em Inglês: Biological activities of wasp (*Polistes lanio lanio*) and ant (*Paraponera clavata*)

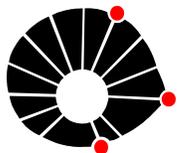
- Keywords:**
- Toxins
 - Cytotoxicity
 - Venom
 - Venom-wasp
 - Neurotoxins
 - Wasp

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Prof. Dr. Sergio Marangoni
Prof. Dr. Lea Rodrigues-Simioni
Prof. Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone
Prof. Dr. Soraia Kátia Pereira Costa

Data da defesa: 15.04.2011



UNICAMP

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Delano Anibal da Silva

Orientador(a)(a): Prof(a). Dr(a). Stephen Hyslop

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Stephen Hyslop

Professor (a) Doutor (a) Sergio Marangoni

Professor (a) Doutor (a) Léa Rodrigues Simioni

Professor (a) Doutor (a) Lanfranco Ranieri Paolo Troncone

Professor (a) Doutor (a) Soraia Kátia Pereira Costa

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/04/2011

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha filha **Amanda Gabriela de Oliveira Silva** e
à minha esposa **CláudiaCristiane de Oliveira Esteves**,
pelo apoio, acalento e companheirismo.*

*À minha mãe **Isabel do Rosário de Souza e irmãs;**
Isabete e Eliete, que sempre me incentivaram e apoiaram
minhas decisões*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Stephen Hyslop.

*Ao Laboratório de Farmacologia e Inflamação do Departamento de
Farmacologia pelo apoio ao ceder drogas.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, pelas condições oferecidas para
a realização deste trabalho.*

*Ao CNPq,
por tornar possível a realização desta tese com a produção de
informação científica e formação de recursos humanos.*

*Ao **José Ilton dos Santos**, técnico do Laboratório de Farmacologia
Bioquímica do Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP, pela grande
e indispensável contribuição nos experimentos e trabalhos realizados e
também pela amizade.*

*Aos **colegas de Programa da Pós-Graduação**, pelo apoio na execução
do projeto.*

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

Meu pecado é ainda maior porque eu, mais sutil ou mais experiente, chame do que quiser, vou morrer sabendo que o meu sacrifício está fundado na teimosia que simboliza nossa civilização apodrecida e decadente. Eu sei também que você morrerá com seu punho cerrado e sua mandíbula tensa, porque você não é um símbolo, mas sim um autêntico membro da sociedade que deve ser destruída; o espírito da colméia fala através de sua boca e move-se através de seus atos, você é tão útil quanto eu, mas não percebe quão útil é sua contribuição para a sociedade que o sacrifica.

Diário de viagem. Ernesto Che Guevara.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| LISTA DE FIGURAS | xvii |
| RESUMO | xxi |
| ABSTRACT | xxiii |
| INTRODUÇÃO GERAL | 25 |
| CAPÍTULO I | |
| 1 – INTRODUÇÃO | 29 |
| 1.1 – Família Formicidae | 30 |
| 1.2 – Aparato venenífero de formigas | 31 |
| 1.3 – Composição das peçonhas de formigas | 31 |
| 1.3.1. Proteínas..... | 32 |
| 1.3.2. Peptídeos..... | 32 |
| 1.3.3. Aminoácidos livres..... | 34 |
| 1.3.4. Aminas biogênicas..... | 34 |
| 1.3.5. Alcalóides..... | 34 |
| 1.3.6. Terpenos..... | 35 |
| 1.3.7. Outros compostos..... | 35 |
| 1.4 – Atividades biológicas | 35 |
| 1.4.1. Atividade inseticida..... | 35 |
| 1.4.2. Antimicrobiana..... | 35 |
| 1.4.3. Citotoxicidade..... | 35 |
| 1.4.4. Neurotoxicidade..... | 36 |
| 1.4.5. Atividade pró- e anti-inflamatória..... | 36 |
| 1.5 – Aspectos clínicos | 37 |
| 1.6 – Subfamília Ponerinae | 37 |
| 1.7 – Poneríneas brasileiras | 38 |
| 2 – OBJETIVOS | 39 |
| 3 – MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.1 – Reagentes..... | 42 |
| 3.2 – Animais..... | 42 |
| 3.3 – Peçonha de formiga..... | 42 |
| 3.4 – Procedimentos experimentais..... | 43 |
| 3.4.1. Conteúdo protéico..... | 43 |
| 3.4.2. Eletroforese..... | 43 |
| 3.4.3. Atividade fosfolipásica..... | 43 |
| 3.4.4. Atividade hemolítica..... | 44 |
| 3.4.5. Fracionamento por FPLC..... | 44 |
| 3.4.6. Íleo isolado de rato..... | 44 |
| 3.4.7. Átrio isolado de rato..... | 45 |
| 3.4.8. Coração semi-isolado de barata..... | 47 |
| 3.4.9. Análise estatística..... | 47 |
| 4 – RESULTADOS..... | 48 |
| 4.1 – Conteúdo protéico e perfil eletroforético..... | 49 |
| 4.2 – Atividades fosfolipásica e hemolítica..... | 49 |
| 4.3 – Perfil cromatográfico..... | 51 |
| 4.4 – Íleo isolado de rato..... | 52 |
| 4.5 – Átrio direito isolado de rato..... | 54 |
| 4.6 – Coração semi-isolado de barata..... | 61 |
| 5 – DISCUSSÃO..... | 63 |
| 5.1 – Composição geral da peçonha de <i>P. clavata</i>..... | 64 |
| 5.2 – Atividades fosfolipásica e hemolítica..... | 64 |
| 5.3 – Fracionamento da peçonha..... | 65 |
| 5.4 – Ação em íleo isolado de rato..... | 66 |
| 5.5 – Ação em átrio isolado direito de rato..... | 67 |
| 5.6 – Lesão cardíaca..... | 69 |
| 5.7 – Ação em coração semi-isolado de barata..... | 70 |
| 6 – CONCLUSÕES..... | 71 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO II | 73 |
| 1 – INTRODUÇÃO..... | 74 |
| 1.1 – Família Vespidae..... | 75 |
| 1.2 – Aparato venenífero de vespas..... | 75 |
| 1.3 – Composição das peçonhas de vespas..... | 76 |
| 1.3.1. Proteínas..... | 76 |
| 1.3.2. Peptídeos..... | 77 |
| 1.3.3. Outros componentes: aminoácidos livres, aminas biogênicas, etc..... | 78 |
| 1.4 – Atividades biológicas..... | 78 |
| 1.4.1. Atividade inseticida..... | 78 |
| 1.4.2. Atividade antimicrobiana..... | 79 |
| 1.4.3. Citotoxicidade..... | 79 |
| 1.4.4. Neurotoxicidade..... | 79 |
| 1.4.5. Atividade inflamatória..... | 80 |
| 1.5 – Mecanismos de ação de toxinas..... | 80 |
| 1.6 – Aspectos clínicos..... | 80 |
| 1.7 – Vespídeos brasileiros..... | 81 |
| 2 – OBJETIVOS..... | 82 |
| 3 – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 84 |
| 3.1 – Reagentes..... | 85 |
| 3.2 – Animais..... | 85 |
| 3.3 – Peçonha de vespa..... | 85 |
| 3.4 – Procedimentos experimentais..... | 86 |
| 3.4.1. Fracionamento por FPLC e HPLC..... | 86 |
| 3.4.2. Coração semi-isolado de barata..... | 86 |
| 3.4.3. Espectrometria de massas..... | 86 |
| 4 – RESULTADOS..... | 87 |
| 4.1 – Conteúdo protéico e perfil eletroforético..... | 88 |
| 4.2 – Atividades fosfolipásica e hemolítica | 88 |

| | |
|--|------------|
| 4.3 – Perfil cromatográfico e purificação da fosfolipase..... | 90 |
| 4.3.1. FPLC..... | 90 |
| 4.3.2. HPLC..... | 91 |
| 4.4 – Íleo e átrio isolados de rato..... | 93 |
| 4.5 – Coração semi-isolado de barata..... | 96 |
| 4.6 – Identificação da toxina por espectrometria de massas..... | 100 |
| 5 – DISCUSSÃO..... | 102 |
| 5.1 – Composição geral da peçonha de <i>P. l. lanio</i>..... | 103 |
| 5.2 – Atividades fosfolipásica e hemolítica..... | 103 |
| 5.3 – Fracionamento da peçonha..... | 104 |
| 5.4 – Ação em íleo isolado de rato..... | 104 |
| 5.5 – Ação em átrio isolado direito de rato..... | 104 |
| 5.6 – Ação em coração semi-isolado de barata..... | 105 |
| 6 – CONCLUSÕES..... | 107 |
| REFERÊNCIAS..... | 109 |
| ANEXO..... | 134 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - Filogenia da família Formicidae..... | 30 |
| FIGURA 2 - Organização estrutural do sistema venenífero de <i>P. clavata</i> | 31 |
| FIGURA 3 - Esquema dos protocolos realizados com átrio direito isolado de rato..... | 46 |
| FIGURA 4 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da peçonha (25 e 50 µg) de <i>P. clavata</i> | 49 |
| FIGURA 5 - Atividade fosfolipásica e hemolítica da peçonha de <i>P. clavata</i> | 50 |
| FIGURA 6 – Perfil de eluição da peçonha de <i>P. clavata</i> após gel filtração..... | 51 |
| FIGURA 7 - Contração induzida pela peçonha de <i>P. clavata</i> em íleo isolado de rato..... | 53 |
| FIGURA 8 - Contração induzida pelos picos cromatográficos da peçonha de <i>P. clavata</i> em íleo isolado de rato..... | 54 |
| FIGURA 9 - Alterações induzidas por peçonha de <i>P. clavata</i> em átrio isolado de rato..... | 55 |
| FIGURA 10 - Efeitos secundários da peçonha de <i>P. clavata</i> sobre a força contrátil (A) e a frequência (B) de átrio isolado de rato | 57 |
| FIGURA 11 - Alterações na força contrátil de átrio isolado de rato incubado com os picos cromatográficos (PI - P5) da peçonha de <i>P. clavata</i> obtidos por gel filtração..... | 58 |
| FIGURA 12 - Efeitos secundários dos picos cromatográficos da peçonha de <i>P. clavata</i> sobre a força contrátil (A) e frequência (B) de átrio direito isolado de rato..... | 59 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 13 - Liberação de CK-MB por átrio direito isolado de rato incubado com peçonha de <i>P. clavata</i> e pico P1 | 60 |
| FIGURA 14 - Dano tecidual em átrio direito isolado de rato incubado com pico P1 aquecido da peçonha de <i>P. clavata</i> | 61 |
| FIGURA 15 - Ação da peçonha de <i>P. clavata</i> sobre a freqüência de coração semi-isolado de barata..... | 62 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - Filogenia da família Vespidae..... | 75 |
| FIGURA 2 - Aparato venenífero de um vespídeo..... | 76 |
| FIGURA 3 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da peçonha de <i>P. I. lanio</i> | 88 |
| FIGURA 4 - Atividade fosfolipásica e hemolítica da peçonha de <i>P. I. lanio</i> | 89 |
| FIGURA 5 - Perfil de eluição da peçonha de <i>P. I. lanio</i> após gel filtração..... | 90 |
| FIGURA 6 - Atividade fosfolipásica específica das frações cromatográficas da peçonha de <i>P. I. lanio</i> | 91 |
| FIGURA 7 - Perfil cromatográfico (RP-HPLC) do pico 3 (gel-filtração) da peçonha de <i>P. I. lanio</i> | 92 |
| FIGURA 8 - Atividade fosfolipásica específica das frações cromatográficas da peçonha de <i>P. I. lanio</i> | 92 |
| FIGURA 9 - Atividade contrátil da peçonha de <i>P. I. lanio</i> em íleo isolado de rato..... | 93 |
| FIGURA 10 - Efeito da peçonha de <i>P. I. lanio</i> sobre a contratatura (A), contratilidade (B) e freqüência de batimentos (C) em átrio direito | |

| | |
|--|-----|
| isolado de rato..... | 94 |
| FIGURA 11 - Bradicardia causada pela peçonha de <i>P. l. lanio</i> em coração semi- isolado de barata..... | 95 |
| FIGURA 12 - Ação bradicárdica da peçonha de <i>P. l. lanio</i> na fração com massa molecular <5 kDa..... | 96 |
| FIGURA 13 - Perfil de eluição (RP-HPLC) dos componentes da peçonha de <i>P. l. lanio</i> com <5 kDa..... | 97 |
| FIGURA 14 - Identificação do pico da peçonha de <i>P. l. lanio</i> com atividade bradicárdica em coração semi-isolado de barata..... | 98 |
| FIGURA 15 - Inibição por glibenclamida (Glib) da bradicardia causada pelo pico 4 da peçonha de <i>P. l. lanio</i> em coração semi-isolado de barata..... | 99 |
| FIGURA 16 - Espectro de massas do pico 4..... | 100 |

RESUMO

RESUMO

As peçonhas de himenópteros contêm diversas toxinas que podem causar hemólise, cardiotoxicidade e insuficiência renal, além de reação de hipersensibilidade. Adicionalmente, algumas vespas e formigas utilizam sua peçonha para imobilizar ou matar a presa. Neste estudo analisamos as atividades fosfolipásica (PLA₂) e hemolítica bem como a atividade biológica sobre íleo e átrio isolados de rato, e sobre coração semi-isolado de barata, das peçonhas de formiga (*Paraponera clavata*) e vespa (*Polistes lanio lanio*). A eletroforese das peçonhas (SDS-PAGE) revelou a presença de componentes com massas moleculares de ~22 kDa a 100 kDa em *P. clavata* e de 19 a 119 kDa em *P. l. lanio*. Já a cromatografia por gel filtração resultou em cinco picos principais para a peçonha de *P. clavata* e seis para a de *P. l. lanio*. A peçonha de *P. clavata* possuiu atividades PLA₂ e hemolítica moderadas, que foram abolidas pelo aquecimento (100°C, 20 min). A peçonha de *P. clavata* (0,1-3 µg/ml) contraiu íleo isolado de rato, cujo efeito foi dessensibilizante e resistente ao aquecimento da peçonha. Esta atividade contraturante foi localizada no primeiro pico do perfil de eluição da cromatografia por gel filtração. Em átrio isolado de rato a peçonha de *P. clavata* (0,125-10 µg/ml) causou contratura, resultando em diminuição da força contrátil e redução na frequência atrial com aumento na liberação de creatinoquinase-MB (CK-MB) tecidual. O aquecimento da peçonha não aboliu esta ação atrial. A análise histopatológica mostrou necrose dos cardiomiócitos que não foi afetada pelo aquecimento. Dos picos obtidos por gel filtração, o pico 1 reproduziu a contratura causada pela peçonha enquanto o pico 3 aumentou a contratilidade atrial. Em coração semi-isolado de barata, a peçonha de *P. clavata* (1-100 µg) causou bradicardia. Conclui-se que a peçonha de *P. clavata*: (1) possui atividades PLA₂ e hemolítica que são termolábeis, (2) causa bradicardia em coração semi-isolado de barata, e (3) provoca contração em íleo isolado e contratura em átrio direito de rato. Ao contrário de *P. clavata*, a peçonha de *P. l. lanio* (0,3-100 µg/ml) mostrou altas atividades PLA₂ e hemolítica que também foram abolidas pelo aquecimento (100°C, 20 min). A peçonha contraiu íleo isolado de rato, e causou inotropismo negativo em átrio direito isolado de rato, sem afetar o cronotropismo; não houve contratura da linha basal. A peçonha causou forte bradicardia em coração semi-isolado de barata que não foi abolido pelo aquecimento (100°C, 20 min). Este cronotropismo negativo foi mediado por uma fração da peçonha de *P. l. lanio* enriquecida em componentes de baixa massa molecular (<5 kDa, obtida através da ultrafiltração). A cromatografia desta fração em HPLC de fase reversa resultou em seis picos, dos quais apenas o pico 4 causou bradicardia em coração semi-isolado de barata. A bradicardia foi bloqueada pela glibenclamida, sugerindo o envolvimento de canais de K⁺ dependentes de ATP neste fenômeno. A análise do pico ativo por espectrometria de massas indicou a presença de peptídeos. Conclui-se que a peçonha de *P. l. lanio*: (1) tem alta atividade fosfolipásica e hemolítica (ambas termolábeis), (2) provoca contração de íleo e inotropismo negativo em átrio direito de rato e (3) exerce forte cronotropismo negativo em coração semi-isolado de barata mediado pela ativação de canais de potássio dependentes de ATP.

ABSTRACT

ABSTRACT

Hymenoptera venoms contain toxins that can cause hemolysis, renal failure, cardiotoxicity and hypersensitivity in humans. Additionally, some wasps and ants use their venom to immobilize or kill prey. In this study, we analyzed the phospholipase (PLA₂) and hemolytic activities of ant (*Paraponera clavata*) and wasp (*Polistes lanio lanio*) venoms, and their action on rat isolated ileum and right atrium and cockroach semi-isolated heart. Electrophoresis (SDS-PAGE) showed that the venoms of *P. clavata* and *P. l. lanio* contained components with molecular masses of ~20-100 kDa and 19-119 kDa, respectively. Gel filtration chromatography resulted in five major peaks for *P. clavata* venom and six for *P. l. lanio*. *Paraponera clavata* venom had moderate phospholipase and hemolytic activities that were abolished by heating (100°C, 20 min). This venom (0.1-3 µg/ml) contracted rat isolated ileum, with a desensitizing effect, and heating the venom did not abolish this activity, which was located in the first peak of the gel filtration elution profile. In isolated atria, the venom (0.125-10 µg/ml) caused muscle contraction that resulted in decreased contractile force and a reduction in atrial rate, with an increase in creatine kinase-MB (CK-MB) release; this atrial action was not abolished by heating. Histopathological analysis revealed myonecrosis that was also unaffected by heating. Of the peaks obtained by gel filtration, peak 1 reproduced the contraction observed with the venom whereas peak 3 caused a sustained increase in atrial contractility. The venom (1-100 µg) caused bradycardia in cockroach semi-isolated hearts. These results show that *P. clavata* venom: (1) has PLA₂ and hemolytic activities that are thermolabile, (2) causes bradycardia in cockroach semi-isolated hearts, and (3) contracts rat isolated ileum and causes contracture of rat right atria. In contrast to *P. clavata*, *P. l. lanio* venom (0.3-100 µg/ml) showed high PLA₂ and hemolytic activities that were also abolished by heating (100°C, 20 min). *Polistes l. lanio* venom contracted rat isolated ileum and produced negative inotropism in isolated rat right atria; there was no effect on the chronotropic response or on the baseline tension, i.e., no muscle contracture. The venom caused marked bradycardia in cockroach semi-isolated hearts that was unaffected by heating. This bradycardia was mediated by a low-molecular mass fraction of the venom (<5 kDa, obtained by ultrafiltration). RP-HPLC of this fraction resulted in six peaks, of which only the fourth caused bradycardia in cockroach semi-isolated hearts. This bradycardia was blocked by glibenclamide, suggesting the involvement of ATP-dependent K⁺ channel activation. Mass spectrometry of the active peak indicated the presence of peptides. These results indicate that *P. l. lanio* venom: (1) has high PLA₂ and hemolytic activities that are thermolabile, (2) contracts rat isolated ileum and reduces the contractile force of isolated right atria, and (3) causes marked bradycardia in cockroach semi-isolated heart via the activation of ATP-dependent K⁺ channels.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A classe Hexápoda é um grupo extremamente diversificado. Distribui-se por quase todas as regiões do planeta, perfazendo um total de mais de 75% de todos os seres vivos (1). A ordem Hymenóptera compreende insetos com peças bucais mastigadoras e ciclo holometábolo (1), com hábitos solitários ou coloniais. Entre estes insetos, as famílias Apidae, Vespidae e Formicidae possuem peçonhas que são utilizadas para defesa e predação, causando dor, dano tecidual, hipersensibilidade alérgica e, ocasionalmente, morte, quando injetadas em mamíferos (2).

As glândulas de peçonhas destes animais podem ser mandibular ou abdominal. No caso da glândula mandibular alguns compostos já foram identificados em vespas e formigas e estão ligados à comunicação na colônia (3,4). Já a peçonha abdominal está presente em fêmeas de algumas espécies da família Vespidae e Formicidae e é produzida por um aparato venenífero que se origina a partir de modificações do aparelho reprodutor destes animais. O aparato venenífero abdominal é constituído por diversas estruturas, que incluem reservatório de peçonha, glândula convoluta, glândula filamentosa e glândula de Dufour, além do aparato do ferrão (5).

Acidentes com vespas e formigas são freqüentes, apesar de sub-notificados. Picadas de himenópteros são capazes de provocar lesões locais ou mesmo reações alérgicas com efeitos sistêmicos, sendo a anafilaxia uma das complicações mais graves (6). No Estado de São Paulo, a taxa de incidência de acidentes com himenópteros foi de 1,57 por 100 mil habitantes em 1998 (7).

Os principais efeitos do envenenamento por formigas e vespas podem ser classificados em locais e sistêmicos. Os efeitos locais incluem edema, eritema, sinais de inflamação. Eventualmente também ocorrem hemorragia e necrose (6,8-10). Já os efeitos sistêmicos incluem choque anafilático, resultante de reação de hipersensibilidade (11,12), cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (13,14). Eventualmente, recomenda-se imunoterapia em pacientes com hipersensibilidade para reduzir o risco de respostas graves a picadas destes insetos (15,16).

Em envenenamentos maciços, nos quais os indivíduos recebem muitas picadas, podem ser observados efeitos sistêmicos graves resultantes da ação direta da peçonha (13). Nestes casos, podem ocorrer hemólise intravascular (com o aumento de K^+ sérico levando à cardiotoxicidade e desenvolvimento de arritmias), rabdomiólise e insuficiência renal aguda (IRA), sendo que as vítimas podem morrer devido à IRA ou complicações cardíacas (17-19).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Formicidae

As formigas fazem parte da família Formicidae que contém de 12.000 a 14.000 espécies amplamente distribuídas no mundo (20). São especialmente conspícuas em ambientes tropicais. Na floresta amazônica, por exemplo, as formigas juntamente com os cupins, correspondem a um percentual de biomassa maior que todos os outros grupos de seres vivos, e exercem importante papel ecológico (21).

Os formicídeos geralmente formam sociedades organizadas em castas, mas pode haver espécies solitárias. Holldobler e Wilson (20) organizaram a família Formicidae de acordo com o esquema apresentado na Figura 1. Algumas modificações e mudanças de táxons foram introduzidas por Bolton (22), que dividiu a Formicidae em 16 subfamílias atuais e quatro extintas.

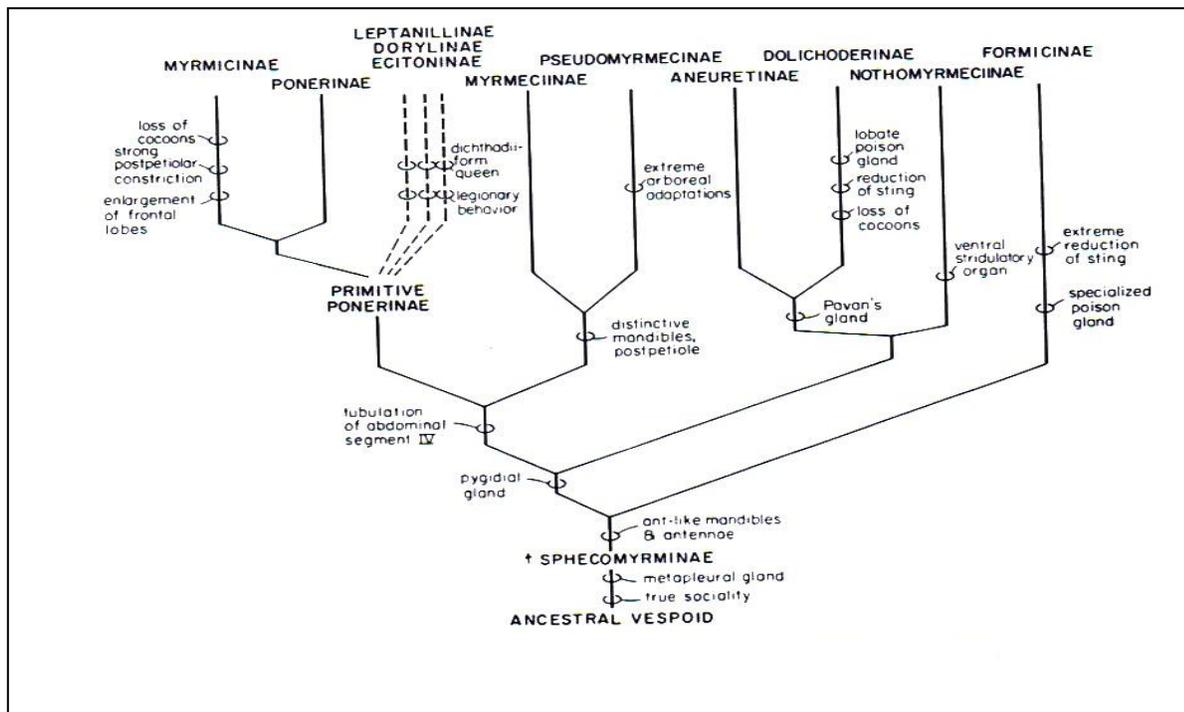


Figura 1. Filogenia da família Formicidae. Fonte: (20).

1.2. Aparato venenífero de formigas

Algumas espécies de formicídeos não são capazes de ferroar, pois têm um aparato venenífero pouco desenvolvido ou ausente, como as espécies da subfamília Formicinae. Por outro lado, várias espécies têm um aparato venenífero desenvolvido sendo, portanto, capazes de ferroar. A Figura 2 apresenta esquematicamente o aparato venenífero de *Paraponera clavata*.

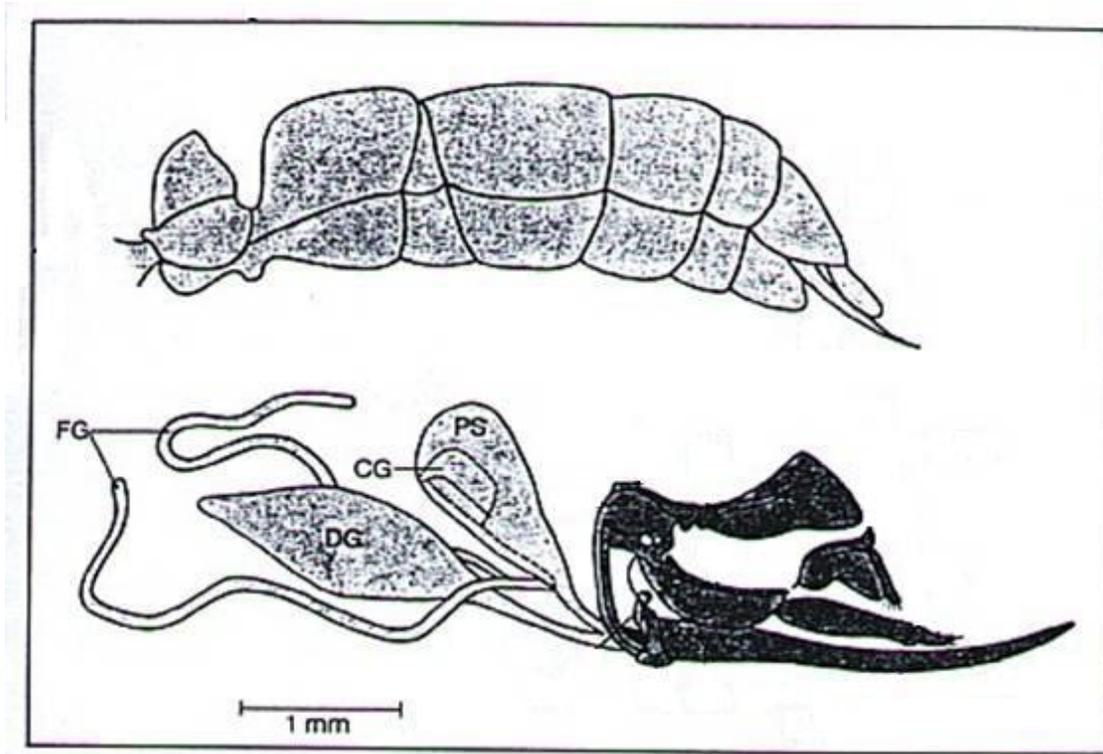


Figura 2. Organização estrutural do sistema venenífero da formiga *P. clavata* (Ponerinae) com as glândulas filamentosas (FG), glândula convoluta (CG), reservatório de peçonha (PS) e glândula de Dufour (DG). Fonte: (5).

1.3. Composição das peçonhas de formigas

A peçonha de formigas é uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, amino ácidos, aminas biogênicas, alcalóides, terpenos e outras substâncias orgânicas, muitas das quais já foram isoladas e caracterizadas (8,23). Em espécies onde predominam características plesiomórficas há predominância de componentes protéicos, porém são encontrados outros componentes, tais como glicídeos e lipídeos, entre outros (5,8,24,25).

1.3.1. Proteínas

As peçonhas de formicídeos contêm diversas proteínas, com ou sem atividade enzimática, e massa molecular variada. Assim, 26 relataram a presença de esterase, fosfolipase A, fosfatases ácida e alcalina, fosfodiesterase, hialuronidase, lipase, e protease em peçonhas de formigas. Adicionalmente, outras enzimas são relatadas, tais como fosfolipases B e C (27).

A peçonha de *Myrmecia pyriformis* contém sete componentes protéicos com massa molecular entre 11 kDa e 23 kDa. Todas as atividades biológicas desta peçonha são atribuídas à histamina e três dos sete componentes protéicos observados. Assim, desta peçonha foi isolada uma proteína de 11 kDa com atividade em músculo liso, e ação hemolítica e liberadora de histamina. Já, na peçonha de *Myrmecia gulosa*, há um componente protéico de migração catódica com atividade em músculo liso e um componente de migração anódica com atividade hemolítica. As peçonhas destas duas espécies apresentam atividade hialuronidásica, além de atividade fosfolipásica em *M. pyriformis* (8).

A peçonha de *Pseudomyrmex triplarinus* tem forte atividade fosfolipásica, e traços de atividades hialuronidásica e fosfatase ácida (28). Por outro lado, a peçonha de *Formica rufa* contém várias isoformas de uma proteína denominada myrmexina, com propriedades anti-inflamatórias (28,29).

As peçonhas do gênero *Pogonomyrmex* contêm esterase, fosfatase ácida, fosfolipases A₂ (PLA₂) e B (PLB), hialuronidase e lipase, além de atividade hemolítica. Já, a peçonha de *Tetramorium caespitum* L., que contém predominantemente componentes protéicos e não possui atividades fosfolipásica e hialuronidásica (30). A peçonha de *Eciton burchelli* tem forte atividade esterásica, mas moderada imunogenicidade e (cito)toxicidade (8).

1.3.2. Peptídeos

As peçonhas de formicídeos contêm uma variedade de peptídeos. Em *Myrmecia pilosula*, foram observados peptídeos fortemente alergênicos (8), o que tem sido confirmado em estudo proteômico desta peçonha (31,32). Desta peçonha

foi isolada uma fração peptídica com propriedades estimulantes em músculo liso, bem como atividade hemolítica e liberadora de histamina, semelhante à melitina e outros componentes encontrados em peçonhas de abelha. Outros peptídeos incluem cininas neurotóxicas (33) e peptídeos como as ponerinas com atividades antimicrobiana, inseticidas e hemolíticas, como em *Pachycondyla goeldii* (34).

A poneratoxina, um polipeptídeo com 25 aminoácidos foi isolado da peçonha de *P. clavata* (35). Esse peptídeo produz um pronunciado aumento da frequência do potencial em miniatura de placa terminal (MEPPs) em diafragma de ratos (36). A poneratoxina também atua sobre canais de sódio de músculo esquelético de sapo, possivelmente induzindo a interconversão entre canais rápidos e lentos deste íon (35,37). Szolajska *et al.* (38) produziram a poneratoxina em cultura de células de insetos e em baculovirus recombinante, a qual foi capaz de diminuir a sobrevivência de insetos injetados.

Dois peptídeos denominados pilosulinas 1 e 2 com propriedades imunogênicas e citotóxicas foram isolados da peçonha de *M. pilosula* (39). Em estudo de expressão foram detectados polipeptídeos homólogos de pilosulina 1 e 2 (40). Davies *et al.* (41) estudaram os peptídeos da peçonha de *M. pilosula* e verificaram sequências de resíduos de aminoácidos que se sobrepõem, além de peptídeos com substituição de um resíduo. Também relataram a presença de pilosulina 1 em peçonha parcialmente degradada, propondo revisão de nomenclatura de alérgenos desta peçonha. Um segmento da pilosulina 1 foi identificado e otimizado, aumentando a atividade antibacteriana e reduzindo a atividade hemolítica (42). Inagaki *et al.* (43) caracterizaram dois novos peptídeos denominados pilosulina 3 e 4 de peçonhas de formigas do gênero *Myrmecia*, com atividade antimicrobiana, liberadora de histamina e baixa atividade hemolítica. Posteriormente, um novo peptídeo denominado pilosulina 5 capaz de provocar a liberação de histamina de mastócitos também foi detectado (23,44). Em peçonha de *Dinoponera australis* foram detectados seis peptídeos semelhantes a peptídeos com diversas atividades biológicas de peçonhas de outras espécies de formigas, como a bombesina, ponerina, e poneratoxina (44).

1.3.3. Aminoácidos livres

Aminoácidos livres têm sido detectados em várias espécies de formigas. A peçonha de *T. caespitum* L. contém glutamato e aspartato (30). Já as peçonhas dos gêneros *Myrmica* e *Pogonomyrmex* apresentam 16 e 17 aminoácidos livres, respectivamente (8).

1.3.4. Aminas biogênicas

A histamina tem sido detectada em peçonhas de varias espécies de formigas como *M. pilosula*, *Myrmica ruginodis* e *T. caespitum* L. (8,30,45). Em *M. pyriformis* e *M. gulosa*, a histamina perfaz um percentual de 2% do peso seco da peçonha (8).

1.3.5. Alcalóides

Peçonhas de formigas do gênero *Solenopsis* e *Monomorium* são enriquecidas com alcalóides, principalmente piperidinas, pirrolidinas e pirrolinas com varias propriedades farmacológicas (8). Estes alcalóides são hidrofílicos e exercem efeito sobre o sistema imune humano, além de ter atividade citolítica, antibiótica e inseticida.

Cinco alcalóides foram detectados em peçonha de *Myrmicaria melanogaster* (46). Alcalóides denominados tetraponerinas, isolados de peçonhas de formigas do gênero *Tetraponera*, agem como moduladores de receptores nicotínicos (47). Alcalóides detectados em peçonhas de espécies do gênero *Monomorium* são precursores na biossíntese de alcalóides encontrados em *Myrmicinae* (48). Os alcalóides presentes na peçonha de *Solenopsis invicta* têm correlação com a idade das formigas (49). Recentemente, alcalóides foram encontrados em peçonhas de formigas lava-pés (*red imported fire ant*) (50). Novos alcalóides também foram encontrados em reinvestigação de peçonhas de *Solenopsis richteri* (51).

1.3.6. Terpenos

Em peçonhas de *Myrmicaria natalensis* e *Crematogaster* sp. foram detectados terpenos e outros compostos de baixa massa molecular altamente tóxico para invertebrados (8).

1.3.7. Outros compostos

Além dos compostos mencionados acima, as peçonhas de formigas também contêm uma grande variedade de outras substâncias. Algumas peçonhas do gênero *Triplaris* possuem um polissacarídeo com propriedades anti-reumáticas (8). Um polissacarídeo também tem sido descrito da peçonha de *Pseudomyrmex* sp. (52). No grupo Formicinae, as peçonhas contêm ácido fórmico, composto volátil, altamente citotóxico e corrosivo. Adicionalmente dois compostos voláteis foram encontrados na peçonha de *Pachycondyla sennaarensis* (53).

1.4. Atividades biológicas

1.4.1. Atividade inseticida

São relatados efeitos tóxicos de peçonhas de diversas espécies de formigas sobre insetos, principalmente do gênero *Pachycondyla* (34,54). Alguns dos componentes responsáveis para esta atividade têm sido isolados, tais como a poneratoxina (38) e cininas neurotóxicas (33).

1.4.2. Antimicrobiana

Diversas peçonhas e toxinas de formigas têm propriedades antimicrobianas, como a solenopsina A, um alcalóide da peçonha de *S. invicta* que inibe sinalização intracelular em *Pseudomonas aeruginosa* (55). Peptídeos com propriedades antibacterianas foram isolados da peçonha de *Pachycondyla goeldii* (34).

1.4.3. Citotoxicidade

As peçonhas de formiga têm propriedades citotóxicas, e.g., *Formica rufa* (8), e uma ação hemolítica, como em *M. pilosula* (45), *Pseudomyrmex triplarinus* (28),

Solenopsis sp. e *M. ruginodis* (8). Da peçonha de *M. pilosula* foram isolados pelo menos tres peptídeos citotóxicos (pilosilina 1, 2 e 3), a citotoxicidade da pilosulina 1 foi diminuída após a clivagem deste peptídeo a partir do resíduo 22 do N-terminal, sugerindo que a citotoxicidade deste peptídeo em células infectadas com o vírus de Epstein Barr (EBV), em glóbulos brancos e a capacidade de lisar eritrócitos depende deste segmento (56). A ectatomina, uma toxina isolada de *Ectatomma tuberculatum*, age na membrana celular formando canais, e age também em canais de cálcio de miocárdio isolado de rato (57).

1.4.4. Neurotoxicidade

São encontradas cininas neurotóxicas em peçonhas de várias espécies de vespas, além de formigas, como a *P. clavata* (33). A poneratoxina também tem atividade neurotóxica (38), sendo capaz de afetar a transmissão neuromuscular em ratos, age pre-sinápticamente aumentando a frequência de liberação espontânea de vesículas sinápticas, e pós-sinápticamente afetando a duração dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) e os potenciais de placa terminal (EPPs) (36). A isosolenopsina A, um alcalóide isolado da peçonha de *Solenopsis invicta*, é um potente inibidor seletivo das isoformas neuronal, endotelial e imunológica da óxido nítrico sintase neuronal, este componente pode ter efeito significativo nas reações adversas das picadas (58).

1.4.5. Atividade pró- e anti-inflamatória

As peçonhas de varias espécies apresentam propriedades anti-inflamatórias. A maioria dos componentes alergênicos das peçonhas de formigas copreende compostos de cerca de 30 kDa (32). 59 demonstraram a presença de IgE específico e IgE ligante em anafilaxia causada por *Pachycondyla chinensis*. Da peçonha de *P. triplarinus* foram isoladas seis isoformas de uma proteína com ação anti-inflamatória em edema experimental (29). A pilosulina 5 da peçonha de *M. pilosula* é capaz de liberar histamina (23).

1.5. Aspectos clínicos

Quanto a envenenamentos por formigas no mundo, a maioria dos relatos corresponde à ocorrência de hipersensibilidade às peçonhas de alguns gêneros como *Solenopsis*, *Myrmeciae*, *Pseudomyrmex* e *Pachycondyla* (11,60,61,62,63). As manifestações locais mais comuns são reações como eritema, dor, piloereção e urticária (64,65), e no local da picada é comum a formação de uma pseudopustula (66,67). Já as manifestações sistêmicas estão freqüentemente associadas a uma hipersensibilidade à peçonha, podendo resultar em uma resposta de fase tardia ou uma anafilaxia, potencialmente fatal (66). Com exceção das formigas “bulldog” australianas, os efeitos tóxicos diretos da peçonha não são letais para seres humanos. A letalidade registrada está mais relacionada a infecções secundárias nas escoriações ou reações alérgicas do que ao envenenamento em si (68).

No que diz respeito as formigas no Brasil, Haddad Júnior *et al.* (9) descreveram os efeitos da picada da falsa tocandira (*Dinoponera gigantea*) em um pescador amador. A picada ocorreu na mão e foram relatados dor forte, sudorese, náusea, vômito, mal estar, taquicardia e linfadenopatia axilar. A dor intensa passou após 8 h, mas houve dor moderada, no local da picada, após 24 h, além de edema e eritema local.

1.6. Subfamília Ponerinae

São poucas as espécies da subfamília Ponerinae cujas peçonhas já foram estudadas. A quantidade de peso seco de peçonha por formiga varia grandemente neste grupo, desde 0.04 mg (*Odontomachus haematodus*) até 0.55 mg (*D. gigantea*). Peçonhas de seis espécies deste grupo já foram investigadas sendo detectadas oito enzimas com baixos níveis de fosfolipase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, e fosfodiesterase; não houve atividade esterásica ou proteolítica. Isto difere das peçonhas de vespas sociais, onde são detectadas fortes atividades para várias destas enzimas. As peçonhas destas espécies possuem atividade cininérgica, além de neurotoxina com atividade em músculo liso e na transmissão sináptica em sistema nervoso central de insetos (8).

Peptídeos neurotóxicos já foram detectados na peçonha de *P. clavata* (35). Há baixa atividade hemolítica comparada a peçonhas de vespas sociais. Em relação à toxicidade, as peçonhas de *Dinoponera grandis* e *O. haematodus* são comparáveis à da maioria das vespas sociais; as peçonhas de *P. clavata* e *Ectatomma quadridens* são comparáveis às das vespas mais tóxicas e a de *E. tuberculatum* é mais tóxica que de qualquer vespa social (8).

A peçonha de *P. clavata* contém três frações que bloqueiam a transmissão sináptica em sistema nervoso central de barata e duas destas frações possuem atividade agonista em músculo liso de mamífero. A poneratoxina desta peçonha exibe forte efeito sobre a atividade elétrica de axônio de barata, fibras musculares esqueléticas isoladas de sapo e fibras musculares esqueléticas isoladas de rato, com prolongamento dos potenciais de ação (35,37).

Orivel e Dejean (34) estudaram a peçonha de formigas do gênero *Pachycondyla* em grilos e observaram que a paralisia rápida era reversível enquanto que a paralisia lenta era irreversível. Isolou-se também peptídeos com propriedades antibacterianas da peçonha de *Pachycondyla goeldii* (34).

1.7. Poneríneas brasileiras

No sudeste do Brasil, há varias espécies de poneríneas, sendo as espécies *Odontomachus chelifer* e *Pachycondyla striata* conspícuas em cerrado na região de Itirapina, no Estado de São Paulo (Oliveira, 2003; informação pessoal). Entretanto, há poucos estudos bioquímicos e farmacológicos destas peçonhas, com exceção daqueles já mencionados acima.

A *P. clavata* é conhecida em algumas regiões do Brasil como tocandira, tem distribuição neotropical. É uma grande formiga predadora de insetos, especialmente larvas de lepidóptera, e pequenos vertebrados (69). Uma neurotoxina, denominada poneratoxina, foi isolada da peçonha desta formiga (33) e utilizada na construção de um bioinseticida (38).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Baseado nas considerações acima, os objetivos deste trabalho foram:

1. Investigar a atividade fosfolipásica e hemolítica da peçonha de *P. clavata*.
2. Investigar a ação da peçonha de *P. clavata* em músculo liso não vascular (íleo isolado de rato).
3. Investigar a atividade cardiotoxica da peçonha em preparações de átrio direito isolado de rato e de coração semi-isolado de barata.
4. Caracterizar a fração responsável pela toxicidade em átrio direito isolado de rato.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Acetilcolina, acrilamida, albumina bovina, azul brilhante de Coomassie, bradicinina, histamina, persulfato de amônia, serotonina, TEMED e Tris foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Proteínas marcadoras de massa molecular pré-coradas foram obtidas da Biorad (Carlsbad, EUA), Superdex G75 foi adquirida da GE Healthcare (Uppsala, Sweden), o glicerol foi da Synth (Diadema, SP), a acetonitrila da Mallinckrodt (Cidade do México, México) e o Triton X-100 da USB (Cleveland, OH, EUA). Álcool e ácido acético foram comprados da Ecibra (Santo Amaro, SP), o isoflurano foi obtido da Cristália (Itapira, SP) e os kits para quantificação de creatine kinase MB eram da LabLabor (São Paulo, SP). Os sais (grau p.a.) para as soluções fisiológicas eram da Baker, Mallinckrodt, Merck ou USB.

3.2. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (250-350 g) obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Os ratos foram alojados 5/caixa, em caixas plásticas com cama de maravalha, a 22 ± 2 °C, sob ciclo de luz/escuro de 12 h e acesso livre à água e ração para roedores (Nuvital®). Os experimentos descritos aqui foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (CEEA/UNICAMP, protocolo no. 1905-1).

As baratas (*Licophea maderae*), obtidas de loja de pesca, foram mantidas em caixas de vidro com substrato de papelão. Os insetos tinham água e ração *ad libitum*.

3.3. Peçonha de formiga

As formigas (*P. clavata*) foram capturadas no município de Carajás, no Estado do Pará. Foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo comum e transportadas ao laboratório, onde foram eutanasiadas por congelamento. A identificação das formigas foi realizada através de chaves

dicotômicas e foi confirmada por especialista (Dr. Harold Gordon Fowler, Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, UNESP, Rio Claro, SP).

Quando necessário, as formigas foram descongeladas e a peçonha foi obtida pela leve compressão das glândulas com uma pinça (sem amassar ou esmagar a glândula) para expelir a peçonha seguida de lavagem das glândulas com água destilada. A peçonha foi posteriormente centrifugada (3 x 10.000 g, 10 min, 4°C), liofilizada e armazenada a -20 °C até ser utilizada. As soluções de peçonha foram preparadas em NaCl 0,9% no dia do uso e armazenadas em gelo até serem utilizadas.

3.4 - Procedimentos experimentais

3.4.1. Conteúdo protéico

O conteúdo protéico da peçonha e das frações cromatográficas foi determinado pelo método de Bradford (70), usando-se albumina bovina como padrão. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.4.2. Eletroforese

O perfil eletroforético da peçonha foi analisado através de SDS-PAGE, essencialmente conforme descrito por Laemmli (71). Foram utilizados géis de acrilamida a 10% e tampão Tris-HCl, pH 8,8, em cuba de minigéis SE260 (GE Healthcare). A corrida foi realizada com amperagem de 25 mA e voltagem de 100 volts por 2 h. Foram incluídas proteínas marcadoras de massa molecular (Bio-Rad) em todas as corridas. Terminada a corrida, os géis foram corados com prata ou com azul brilhante de Coomassie.

3.4.3. Atividade fosfolipásica

O ensaio para a atividade fosfolipásica foi feito segundo Beghini *et al.* (72). Neste ensaio utiliza-se como substrato o ácido benzóico ligado a nitrogênio, que ao ser clivado libera o produto colorimétrico. A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) foi usada como controle positivo. No ensaio foram utilizados 1 mg de substrato e 0,1 mg de proteína em tampão fosfato com pH 8,0 e incubados

a 37°C por 30 min. A absorbância foi lida em 420 nm e o ensaio foi feito em triplicata. A atividade enzimática foi expressa em unidade enzimática, onde cada unidade corresponde a 1 mg de produto liberado/mg de proteína/min, nas condições experimentais utilizadas.

3.4.4. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi determinada usando uma suspensão de 5% de eritrócitos de ratos lavados em salina (NaCl 150 mM) tamponado com fosfato (PBS, pH 7.4). Alíquotas (1 ml) foram incubadas com 0,1 mg de peçonha durante 30 min a 37°C, e em seguida as amostras foram centrifugadas a 600 g durante 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi então lida a 540 nm e comparada com uma curva-padrão obtida de diluições seriadas do controle positivo (eritrócitos lisados em PBS + Triton X-100); o controle negativo foi uma suspensão de 5% de eritrócitos lavados em PBS (pH 7.4) (28). Foram realizados testes com peçonha aquecida a 100 °C por 20 min.

3.4.5. Fracionamento por FPLC

A peçonha foi fracionada por gel filtração em FPLC usando-se coluna de Superdex 75 (Tricorn 1 cm x 20 cm) equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 8. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão em fluxo de 0,3 ml/min e o perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm usando um sistema cromatográfico ÄKTApurifier10. Frações de 1 ml foram coletadas e avaliadas por atividade biológica.

3.4.6. Íleo isolado de rato

Os animais foram eutanasiados com isoflurano e o íleo foi retirado e colocado em solução de Tyrode (composição, em mM: NaCl 137; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; KCl 2,7 e glicose 11,1), pH 7,4 quando borbulhada com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂). Após limpeza, fragmentos do íleo (4 cm) foram montados sob uma tensão de 2,1 g num banho contendo 10 ml de solução Tyrode borbulhada com carbogênio a 37°C. A atividade contrátil do

tecido foi registrada através de transdutores isotônicos conectados a um polígrafo (GraphTec). Após 30 min para estabilização, a reatividade da preparação foi testada utilizando acetilcolina (0,1 μ M), e em seguida doses crescentes (não cumulativas) com lavagens entre concentrações da peçonha foram aplicadas e a resposta registrada até atingir um máximo. As contrações foram expressas relativas à contração máxima obtida com acetilcolina.

Para avaliar a possibilidade de dessensibilização do tecido pela aplicação de várias concentrações de peçonha no mesmo tecido foram usados dois protocolos. No primeiro, a curva concentração-resposta foi obtida aplicando-se apenas uma concentração de peçonha por tecido, ou seja, concentrações individuais e não cumulativas. No segundo, o tecido foi incubado com apenas uma concentração fixa de peçonha que foi aplicada três vezes consecutiva, com lavagem do tecido entre os testes. Os registros foram obtidos e os resultados expressos conforme indicado acima.

3.4.7. Átrio isolado de rato

Os ratos foram heparinizados, após quinze minutos foram anestesiados com isoflurano e foi realizada a torocotomia bilateral. Em seguida, os corações foram rapidamente removidos e mergulhados em solução de Krebs-Henseleit (composição, em mM: NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 0,45; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,03; D-glicose 11,1; ácido ascórbico 0,14; pH 7,4). Logo após, o átrio direito foi isolado do músculo cardíaco e limpo antes de ser montado sob tensão de 1 g em um banho de órgão contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit mantida a 37°C e continuamente gaseificada com 95% O₂ + 5% CO₂ (73). A frequência e a força contrátil foram registradas continuamente através de um transdutor isométrico acoplado a um pré-amplificador e computador (ADInstruments, Castle Hill, Austrália), e os registros foram feitos com o software Chart 6 (PowerLab, ADInstruments). Após 45 min de estabilização, os átrios foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit e, após adição de nova solução, foram incubados por mais 15 min para permitir recuperação de eventuais efeitos das lavagens. Em seguida, foram incubados ou com solução de Krebs-

Hensleit (controles) ou com peçonha (0,125 - 10 $\mu\text{g/ml}$). A frequência cardíaca atrial e a força de contração foram monitoradas durante 60 min (Fig. 3).

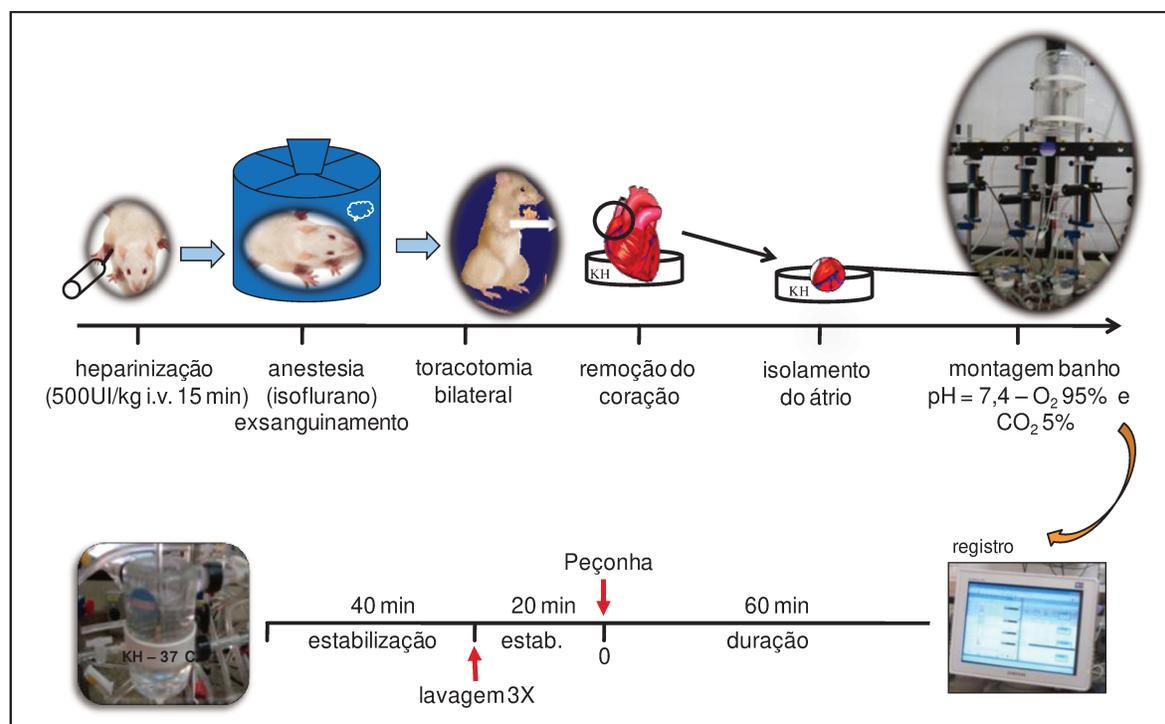


Figura 3. Esquema dos protocolos realizados com átrio direito isolado de rato (74). KH – solução Krebs-Henseleit.

Para investigar o possível dano tecidual causado pela peçonha em átrio isolado foi quantificada a liberação da enzima creatinoquinase-MB (CK-MB) e feita a análise histológica do tecido. Para a quantificação de CK-MB, foram coletados 200 μl de solução do banho antes da adição de peçonha (basal) e ao final do experimento (após incubação de 60 min com a peçonha). A atividade CK-MB foi determinada pelo método cinético usando kits comerciais (Laborlab, São Paulo, SP), seguindo-se as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em U/ml, e a leitura foi feita usando-se um espectrofotômetro DU 800 (Beckman Coulter).

Para análise histológica, ao final do experimento, o tecido atrial foi fixado em formol tamponado (10%) durante 18 h. Após três lavagens por 15 min, o tecido foi desidratado em gradiente crescente de etanol, seguido de diafanização em xylol,

embebição e inclusão em parafina (Histosec-Merck). Secções de 5 µm de espessura foram obtidas (micrótomo Leica RM 2245, Alemanha), e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise das alterações histológicas. As lâminas foram examinadas em microscópio Leica DM 5000B e as imagens foram captadas, processadas e analisadas usando uma câmara CCD Leica CTR 5000 e softwares de processamento e análises de imagem Leica Q Win Plus v.3.2.0.

3.4.8. Coração semi-isolado de barata

A atividade cardiotóxica da peçonha e de frações também foi avaliada usando-se a preparação de coração semi-isolado de barata (*Leucophea madere*) (75,76,77). Os insetos foram mantidos à temperatura ambiente em terrário de vidro com acesso livre à água e ração. Para uso, os insetos foram anestesiados com clorofórmio e imobilizados com a superfície ventral voltada para cima. Com a ajuda do microscópio estereoscópico, foi feita uma incisão abdominal para expor os órgãos internos. O trato digestivo e outras vísceras foram deslocados para expor o coração que foi banhado em salina à temperatura ambiente. Após 10 min para estabilização da frequência cardíaca, a peçonha ou fração purificada (em 10-30 µl de salina) foi aplicada ao coração e as alterações foram monitoradas durante 30 min. A frequência cardíaca foi monitorada continuamente com câmera de vídeo montada no microscópio.

3.4.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± EPM, a análise estatística foi feita através do teste t de Student ou da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Prism versão 4 (Graphpad Inc., La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Conteúdo protéico e perfil eletroforético

A dosagem protéica mostrou que o conteúdo protéico da peçonha de *P. clavata* corresponde a $64 \pm 11\%$ ($n=6$) do peso seco.

A análise eletroforética mostrou que a peçonha possui várias bandas protéicas, com predominância de quatro componentes de aproximadamente 110 kDa, 65 kDa, 38 kDa e 22,5 kDa (Fig. 4).

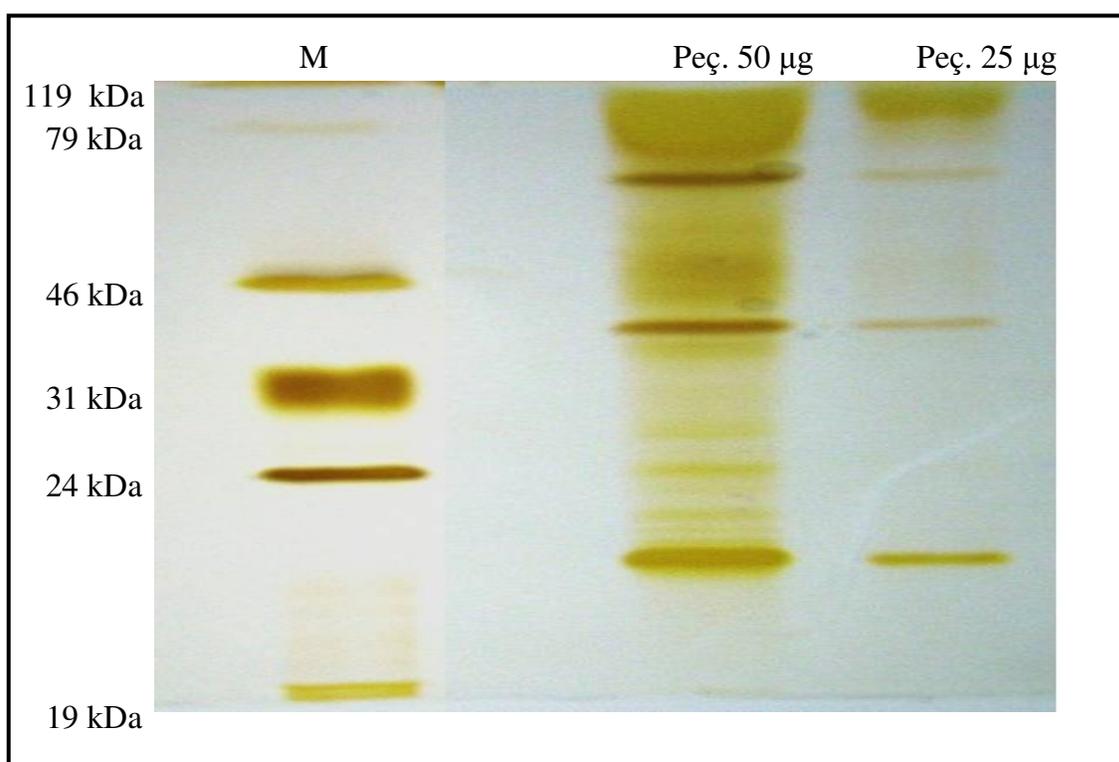


Figura 4. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da peçonha (25 e 50 µg) de *P. clavata*. Foi usado um gel de acrilamida de 10% e as proteínas foram visualizadas usando coloração por prata. As posições dos marcadores de massa molecular (M, em kDa) estão indicadas à esquerda.

4.2. Atividades fosfolipásica e hemolítica

A Figura 5A mostra a atividade fosfolipásica da peçonha de *P. clavata* durante 30 min de incubação. A atividade específica da peçonha foi de 0,141 U/mg. O aquecimento prévio da peçonha (100°C, 20 min) aboliu a atividade

fosfolipásica.

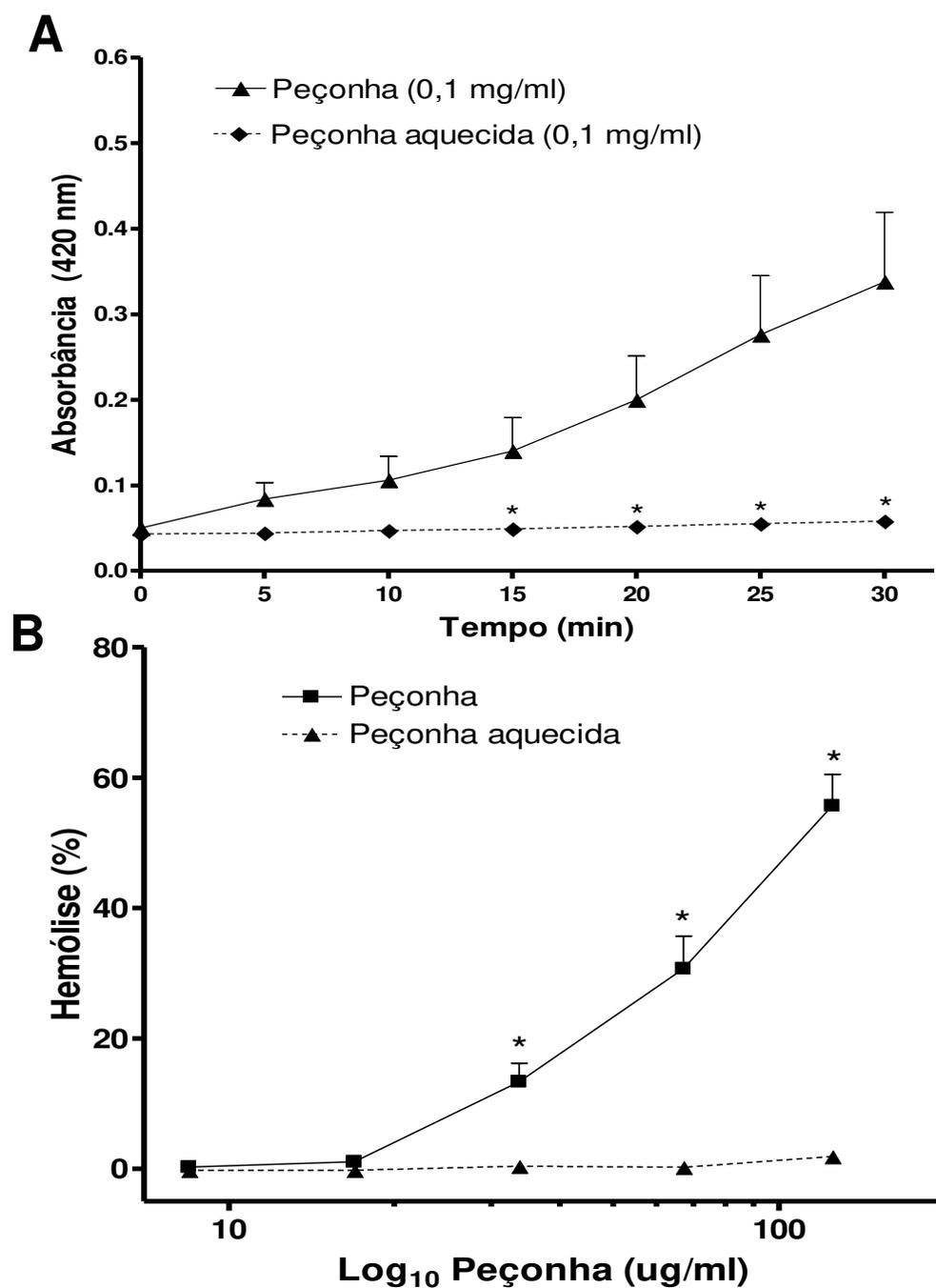


Figura 5. A. Atividade fosfolipásica da peçonha de *P. clavata* (0,1 mg/ml). **B.** Atividade hemolítica da peçonha de *P. clavata* em suspensão de eritrócitos de ratos. Os pontos em **A** e **B** são a média \pm EPM de seis animais. * $p < 0,05$ comparado com peçonha não aquecida.

A Figura 5B ilustra a atividade hemolítica da peçonha de *P. clavata*, mostrando que é dependente da concentração testada. Conforme visto com a atividade fosfolipásica, o aquecimento prévio também aboliu a atividade hemolítica da peçonha.

4.3. Perfil cromatográfico

A cromatografia da peçonha de *P. clavata* por gel filtração em resina Superdex 75 resultou em cinco picos principais (P1-P5), com o primeiro pico apresentando boa resolução em relação aos demais (Fig. 6). Estes picos corresponderam, respectivamente, a 26%, 17%, 24%, 25% e 8% da proteína recuperada. A análise eletroforética destes picos mostrou que o pico P1 continha uma proteína majoritária de 35 kDa e um componente menor de ~24 kDa; os outros picos continham proteínas de ~20-30 kDa.

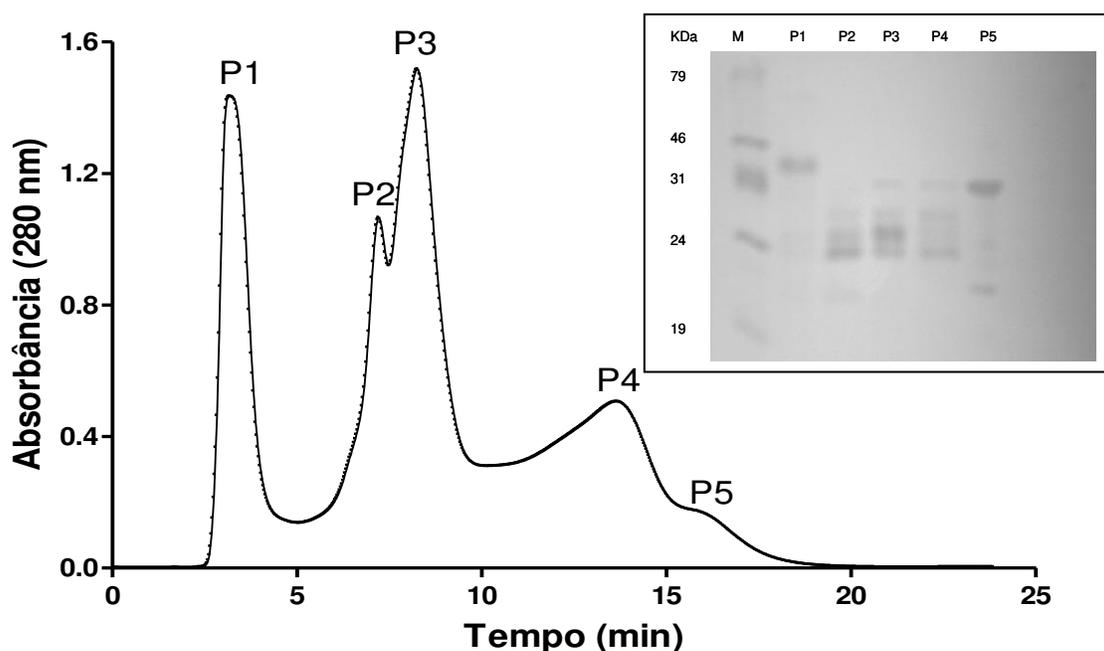
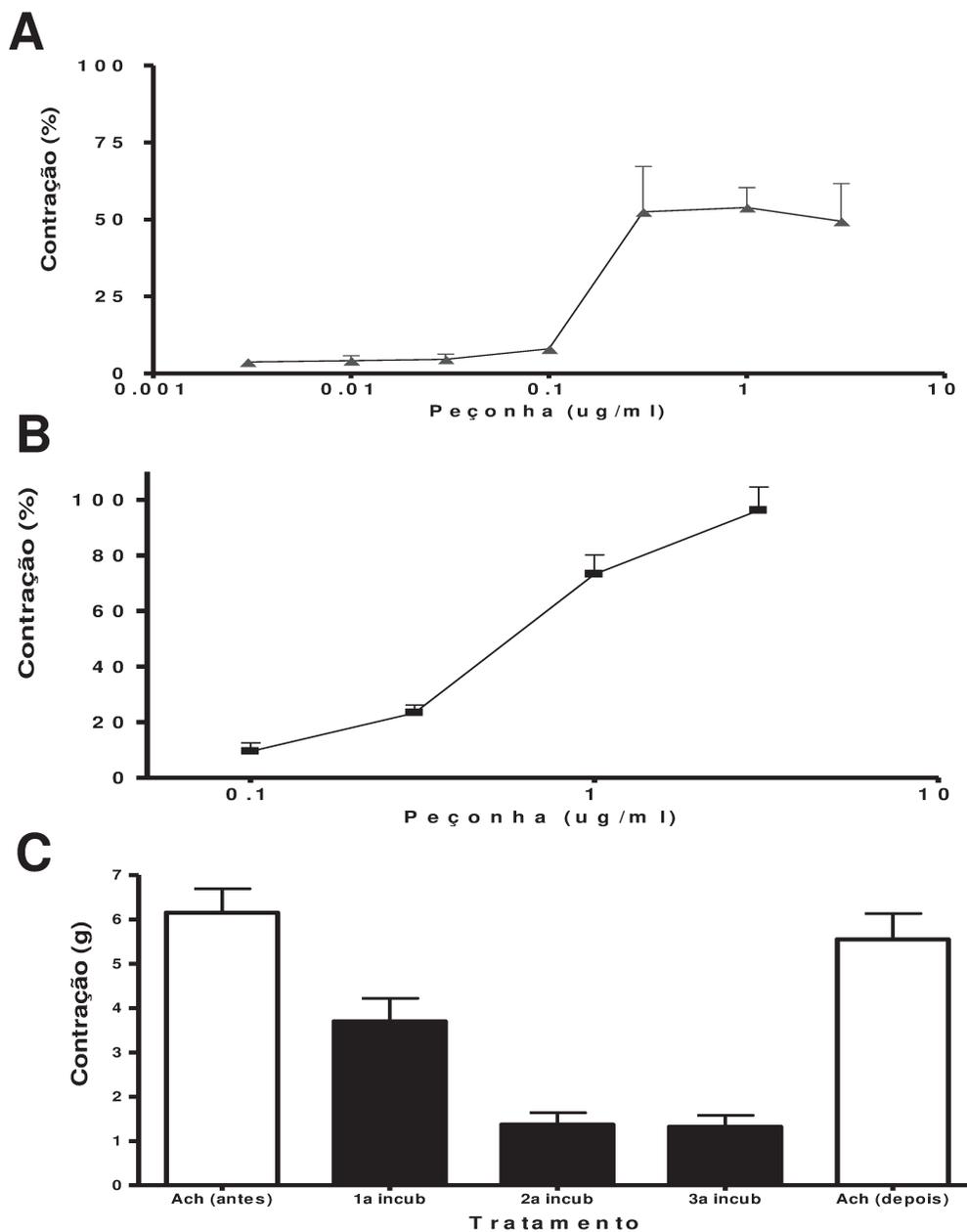


Figura 6. Perfil de eluição da peçonha de *P. clavata* após gel filtração. A peçonha (5 mg) foi dissolvida em 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, e fracionada conforme descrito nos Métodos. Detalhe: Perfil eletroforético de P1 a P5 (50 µg cada) em gel de 10%. As bandas de proteínas foram detectadas através da coloração com azul brilhante de Coomassie.

4.4. Íleo isolado de rato

A Figura 7A mostra a curva concentração-resposta obtida em íleo de rato incubado com concentrações crescentes (não-cumulativas) da peçonha de *P. clavata*. A resposta máxima (~50% da resposta à acetilcolina) foi obtida com 0,3 µg/ml, não sendo alterada por concentrações até 3 µg/ml, o que sugere a possibilidade de dessensibilização desencadeada pela exposição repetida à peçonha. De fato, quando as concentrações de peçonha foram testadas individualmente (apenas uma concentração por tecido), não foi visto achatamento da curva concentração-resposta (Fig. 7B); neste caso, a resposta máxima observada com a maior concentração testada foi quase igual à da ACh (comparar com o máximo de 50% visto no protocolo anterior). Quando a mesma concentração foi testada repetidas (três) vezes, observou-se uma redução em >50% nas respostas à segunda e terceira exposições quando comparado à primeira (a primeira resposta correspondia a 65% da contração obtida com ACh enquanto a segunda e terceira repostas correspondia à 25% desta máxima) (Fig. 7C). Esta dessensibilização era específica para a peçonha, não sendo observada alteração na resposta à ACh após as incubações com peçonha.

A Figura 8 mostra que dos picos cromatográficos da peçonha de *P. clavata* obtidos por exclusão molecular, apenas o primeiro (P1) causou contração do íleo semelhante àquela observada com a peçonha. Todos os picos foram testados na mesma concentração (1 µg/ml).



Fi

gura 7. Contração induzida pela peçonha de *P. clavata* em íleo isolado de rato. **A.** Curva concentração-resposta de peçonha de *P. clavata* no mesmo fragmento de íleo isolado de rato. **B.** Curva concentração-resposta obtida usando apenas uma concentração de peçonha em cada ponto por fragmento de íleo. **C.** Contrações obtidas em íleo exposto à mesma concentração de peçonha de *P. clavata* (1 μ g/ml) repetidas (três) vezes, com lavagem entre as incubações (incub). Em **A** e **B**, as contrações são expressas como porcentagem da resposta à ACh (0,1 μ M). Os pontos ou colunas são a média \pm EPM de seis animais. * $p < 0,05$ comparado à resposta à primeira incubação.

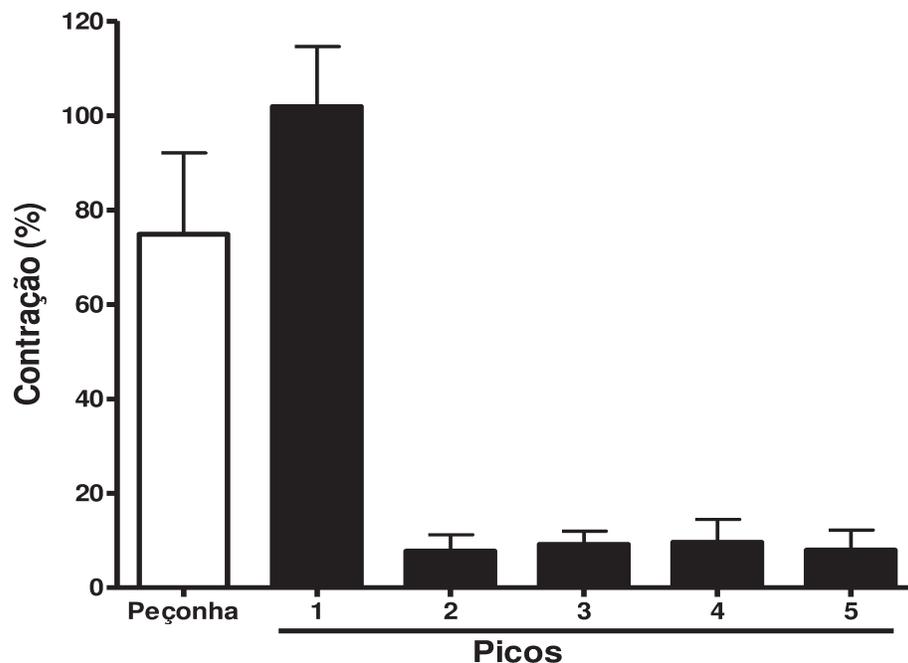


Figura 8. Contração induzida pelos picos cromatográficos da peçonha de *P. clavata* em íleo isolado de rato. A peçonha e todos os picos foram testados na mesma concentração (1 µg/ml). As colunas são a média ± EPM de seis animais.

4.5. Átrio direito isolado de rato

A Figura 9A mostra traçados representativos da ação da peçonha de *P. clavata* sobre o átrio direito de rato. Nota-se uma contratura progressiva (aumento da linha de base) do tecido que depende da concentração de peçonha testada, sendo significativa com a maior concentração (10 µg/ml) a partir dos 5 min; não houve alteração significativa com as outras concentrações (Fig. 9B). Nas concentrações de 0,25 e 0,5 µg/ml houve também um aumento de curta duração da força de contração antes da contratura (Fig. 9A).

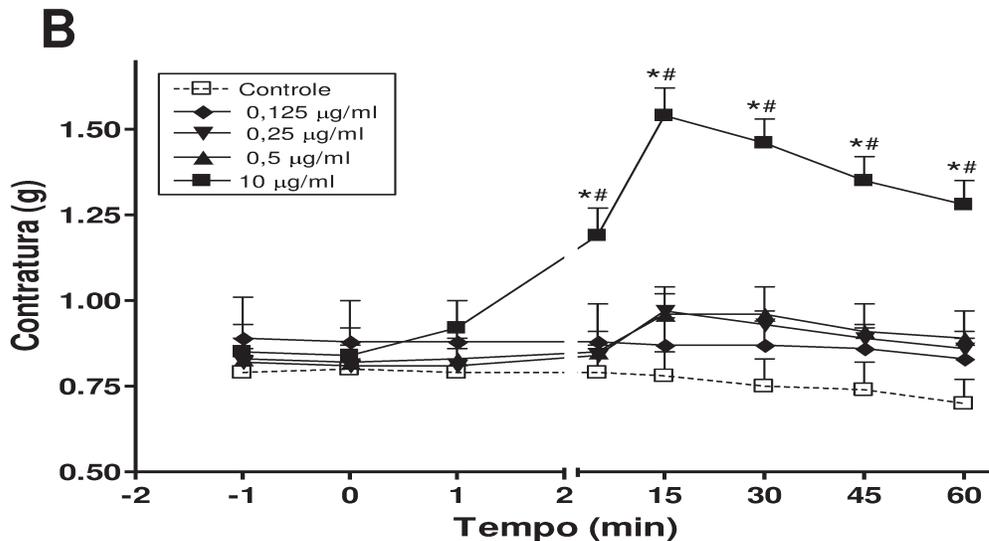
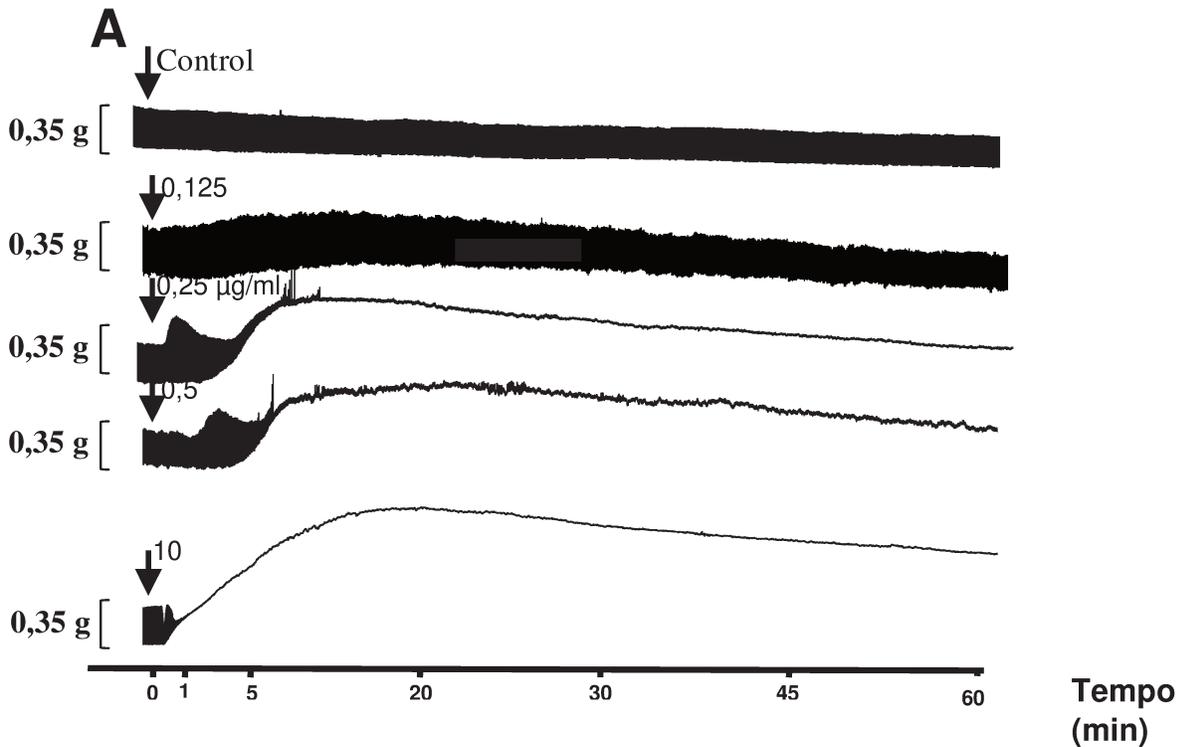


Figura 9. Alterações induzidas por peçonha de *P. clavata* em átrio isolado de rato. **A.** Redução na força contrátil do átrio direito isolado de rato, incubados com peçonha de *P. clavata*. Nota-se a contração muscular (aumento da linha de base), produzida por concentrações $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$. Estes traçados são representativos de seis animais para cada concentração de peçonha. **B.** Redução da contração muscular (g) produzida por peçonha de *P. clavata*. Os pontos representam a média \pm EPM ($n = 6$). * $^{\#}$ $p < 0,05$ comparado com os valores basais (tempo zero) ($^{\#}$) e com o grupo controle (sem peçonha) (*).

A Figura 10 mostra os efeitos secundários da peçonha de *P. clavata* sobre a força de contração e a frequência atrial, tendo em ambos os casos uma queda progressiva, dependendo da concentração de peçonha testada. Estes efeitos são considerados secundários uma vez que resultam do efeito principal da peçonha, que é a contratura marcante que leva à diminuição da força contrátil e da frequência.

Os efeitos das frações cromatográficas no átrio direito isolado de rato estão mostrados na Figura 11. Tanto os traçados representativos de cada pico (Fig. 11A) quanto os valores médios (Fig. 11B) mostram que apenas o pico P1 apresentou o perfil de atividade (forte contratura e subida da linha de base) visto com a peçonha. No caso do pico P3, houve aumento na força contrátil sem alteração marcante na linha de base. Conforme visto com a peçonha, a contratura marcante causada pelo pico P1 resultou em diminuição secundária na força contrátil (Fig. 12A) e frequência (Fig. 12B) em átrio direito isolado de rato. Além disso, o pico P3 provocou pequeno aumento na força contrátil nos primeiros minutos após aplicação, mas não houve diferença significativa em relação aos valores basais (Fig. 12A). O aquecimento (100°C, 20 min) do pico P1 não afetou sua capacidade de induzir contratura em tecido atrial (Fig. 12C).

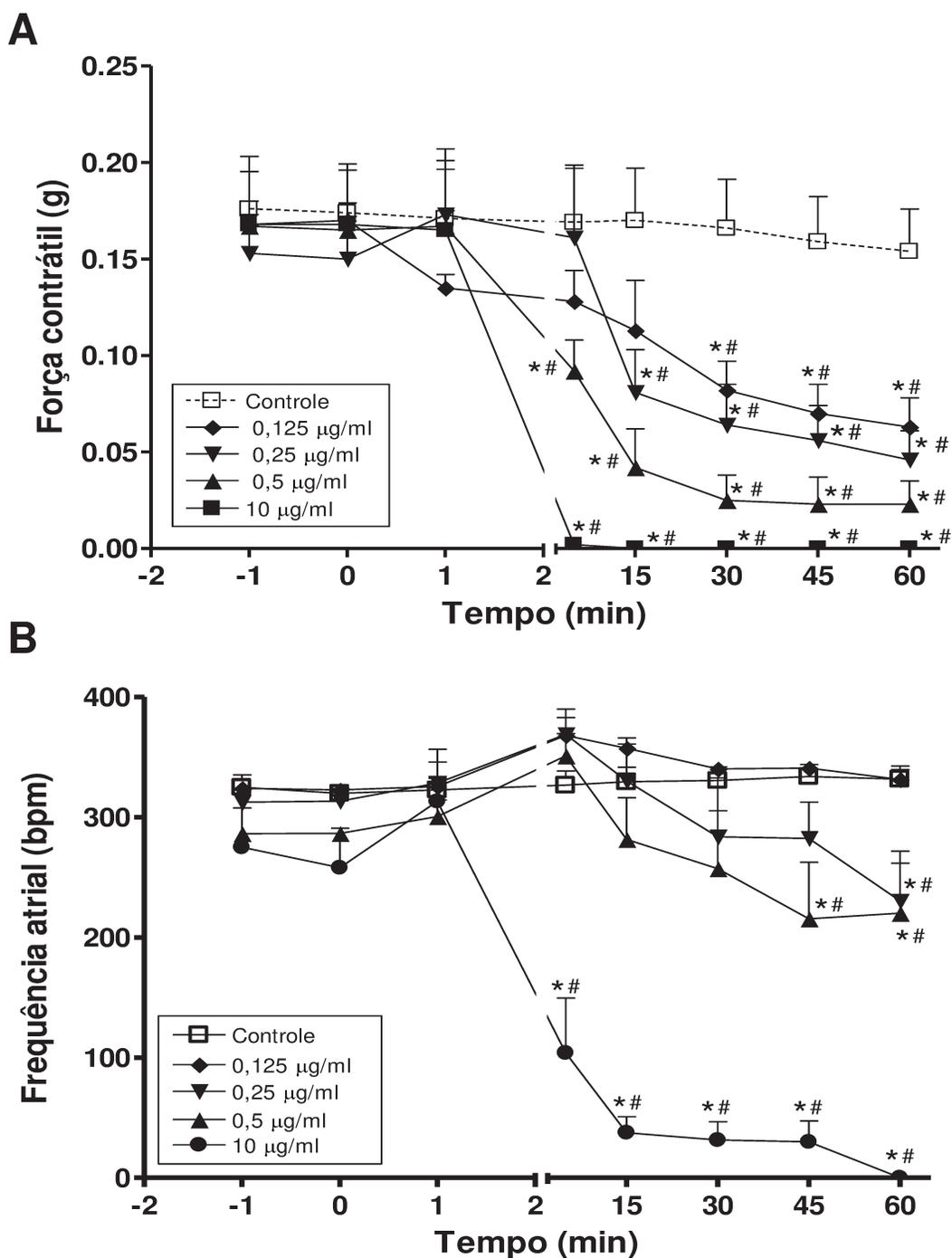


Figura 10. Os efeitos secundários da peçonha de *P. clavata* sobre a força contrátil (A) e a frequência (B) do átrio isolado de rato. Os grupos controle foram incubados com solução de Krebs-Henseleit. Os pontos representam a média \pm EPM (n = 6). *#p<0,05 comparado com os valores basais (tempo zero) (#) e com o grupo controle (sem peçonha) (*).

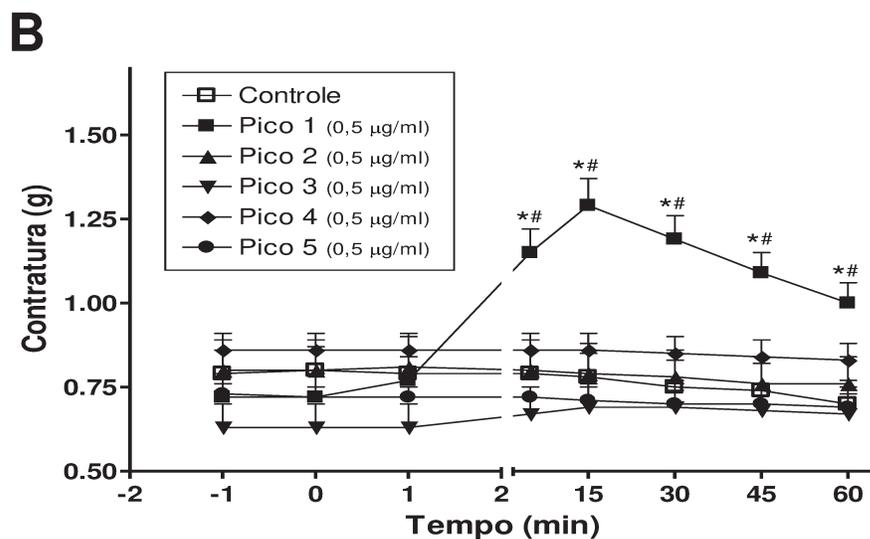
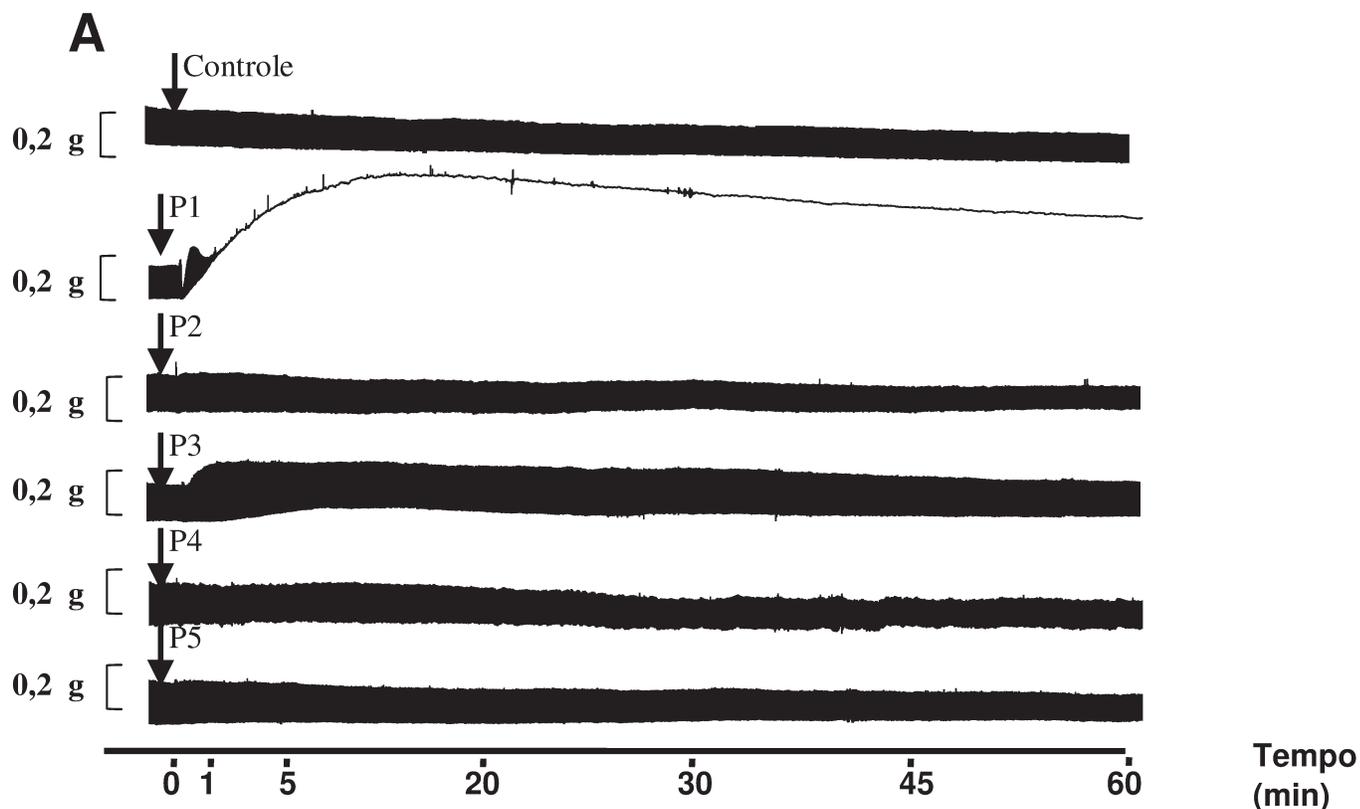


Figura 11. A. Alterações na força contrátil de átrio isolado de rato incubado com os picos cromatográficos (P1-P5) da peçonha de *P. clavata* obtidos por gel-filtração. Note-se a contratura muscular acentuada (aumento da linha de base) produzida pelo pico P1 (compare com a Fig. 9A). Estes traçados são representativos de seis animais para cada concentração da peçonha. **B.** Valores médios da contratura muscular (0,5 µg) produzida pelos picos cromatográficos da peçonha de *P. clavata*. Os pontos representam a média ± EPM (n = 6). *, #p<0,05 comparado com os valores basais (tempo zero) (#) e com o grupo controle (sem peçonha) (*).

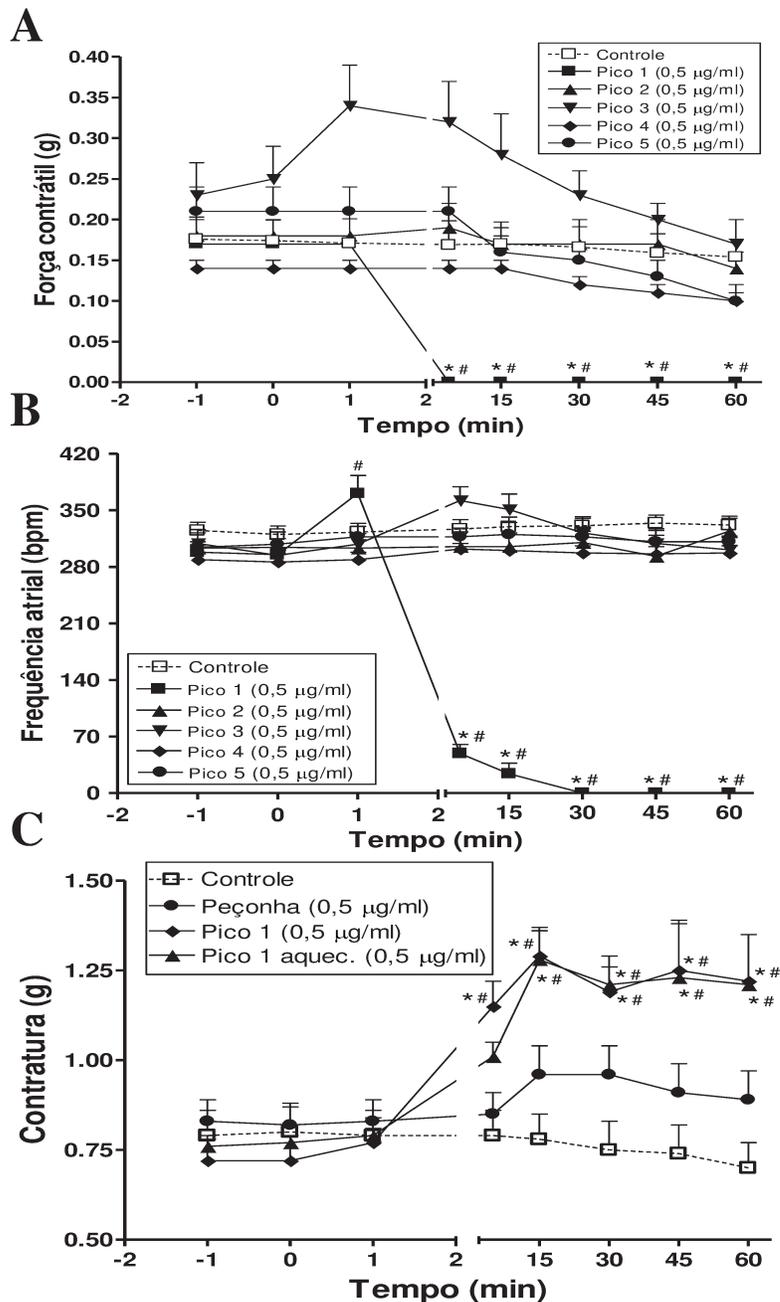


Figura 12. Efeitos secundários dos picos cromatográficos da peçonha de *P. clavata* sobre a força contrátil (**A**) e frequência (**B**) do átrio direito isolado de rato. Todas as frações foram testadas na mesma concentração (0,5 µg/ml). (**C**) Ausência de efeito do aquecimento (100°C, 20 min) sobre a contratura muscular produzida pelo pico P1. Em todos os casos, os controles foram incubados com solução de Krebs-Henseleit. Os pontos são a média ± EPM (n = 5-8). *,# p<0,05 comparado com os valores basais (tempo zero) (*) e com o grupo controle (sem peçonha) (#).

A Figura 13 mostra que houve liberação significativa da enzima CK-MB de átrio isolado de rato após 60 min de incubação com peçonha de *P. clavata* e pico P1 (0,5 µg/ml cada). Esta liberação não foi abolida pelo aquecimento.

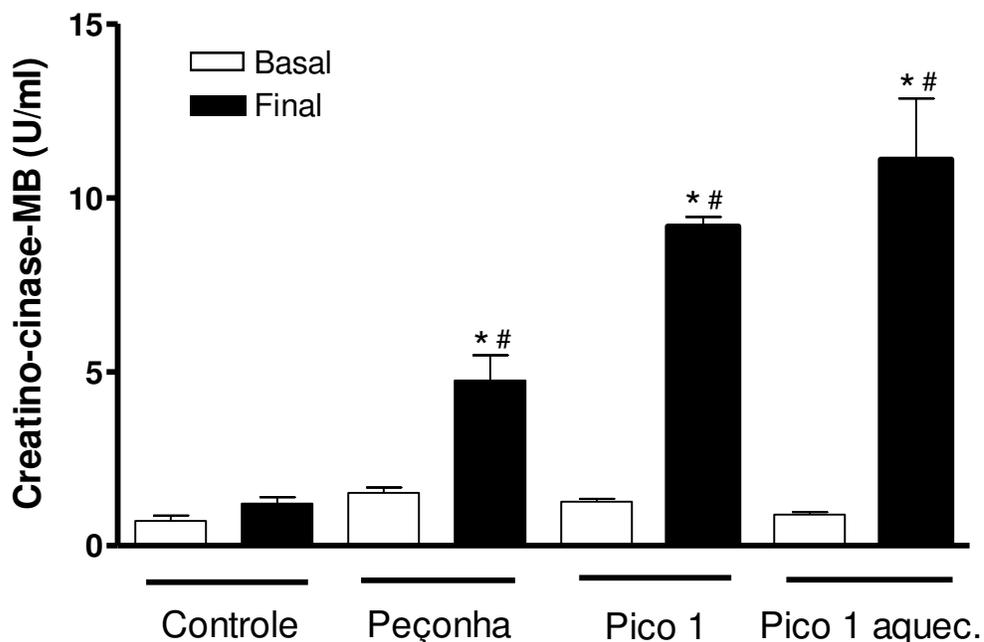


Figura 13. Liberação de CK-MB por átrio direito isolado de rato incubado com peçonha de *P. clavata* e pico P1. Basal e final - antes e depois de incubação por 60 min com peçonha ou P1. Os átrios controle foram incubados com solução de Krebs-Henseleit. As colunas são a média \pm EPM (n = 6). ^{*#}p<0,05 comparado com os valores basais (*) e com o grupo controle (#) após 60 min.

As alterações histológicas observadas após incubação com pico P1 aquecido estão mostradas na Figura 14, onde é possível ver lesão dos cardiomiócitos e desorganização das fibras musculares quando comparado ao tecido controle incubado apenas com solução Krebs-Henseleit.

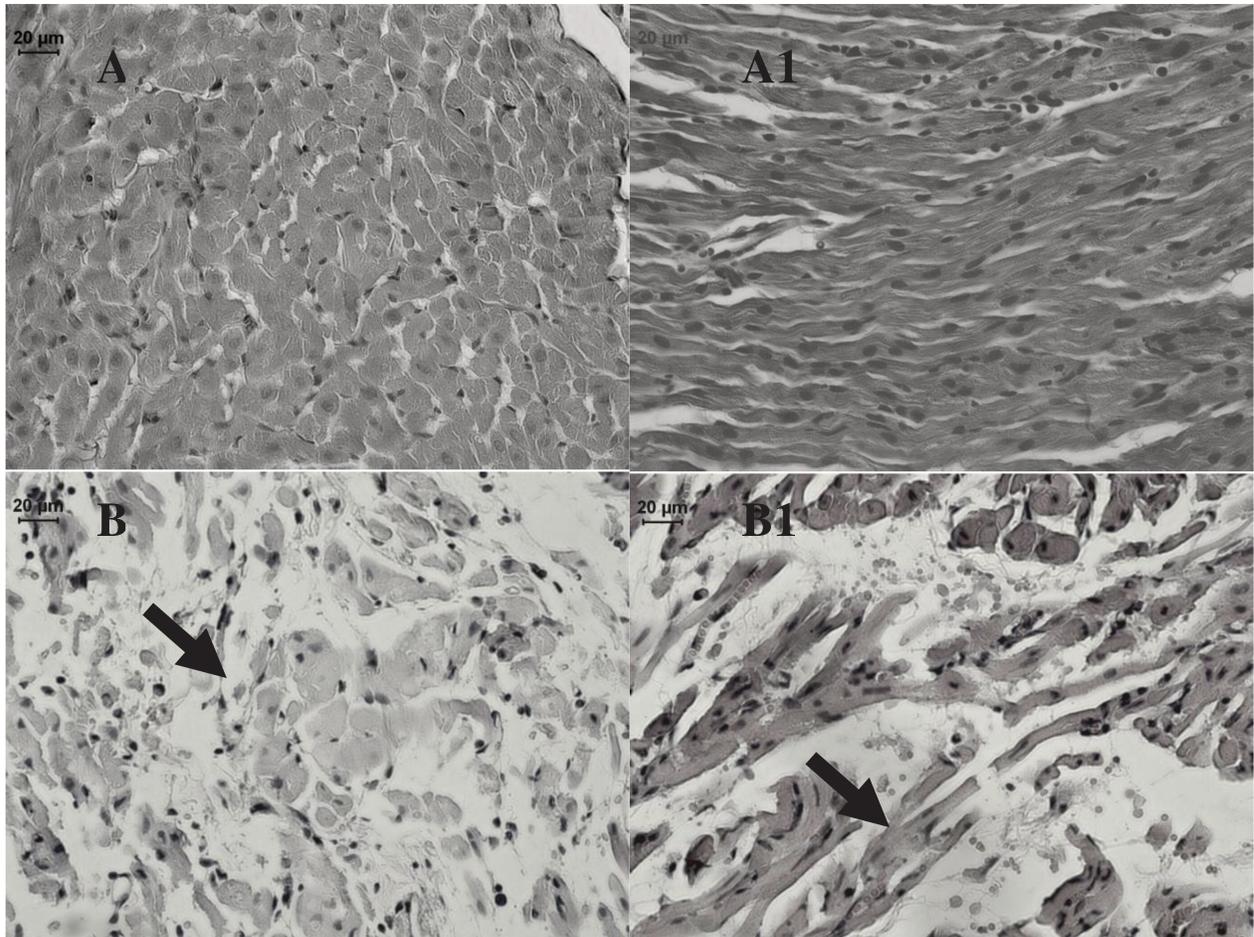


Figura 14. Dano tecidual em átrio direito isolado de rato incubado com pico P1 aquecido (100 °C, 20 min) da peçonha de *P. clavata*. A e A1 - átrio controle (60 min em solução de Krebs-Henseleit), mostrando o músculo cardíaco normal com fibras bem organizadas. B e B1 - átrio incubado com pico P1 aquecido (0,5 µg/ml). Em ambos os casos, o dano tecidual foi avaliado após incubação de 60 min. As setas indicam cardiomiócitos danificados e desorganização das fibras musculares. Corte transversais (A e B) e longitudinais (A1 e B1) corados com hematoxilina-eosina. Barras de escala: 20 µm.

4.6. Coração semi-isolado de barata

Em coração semi-isolado de barata a peçonha diminuiu a frequência cardíaca de maneira dependente da dose, com retorno à frequência normal em doses menores (≤ 10 µg); não houve recuperação com 100 µg de peçonha (Fig. 15).

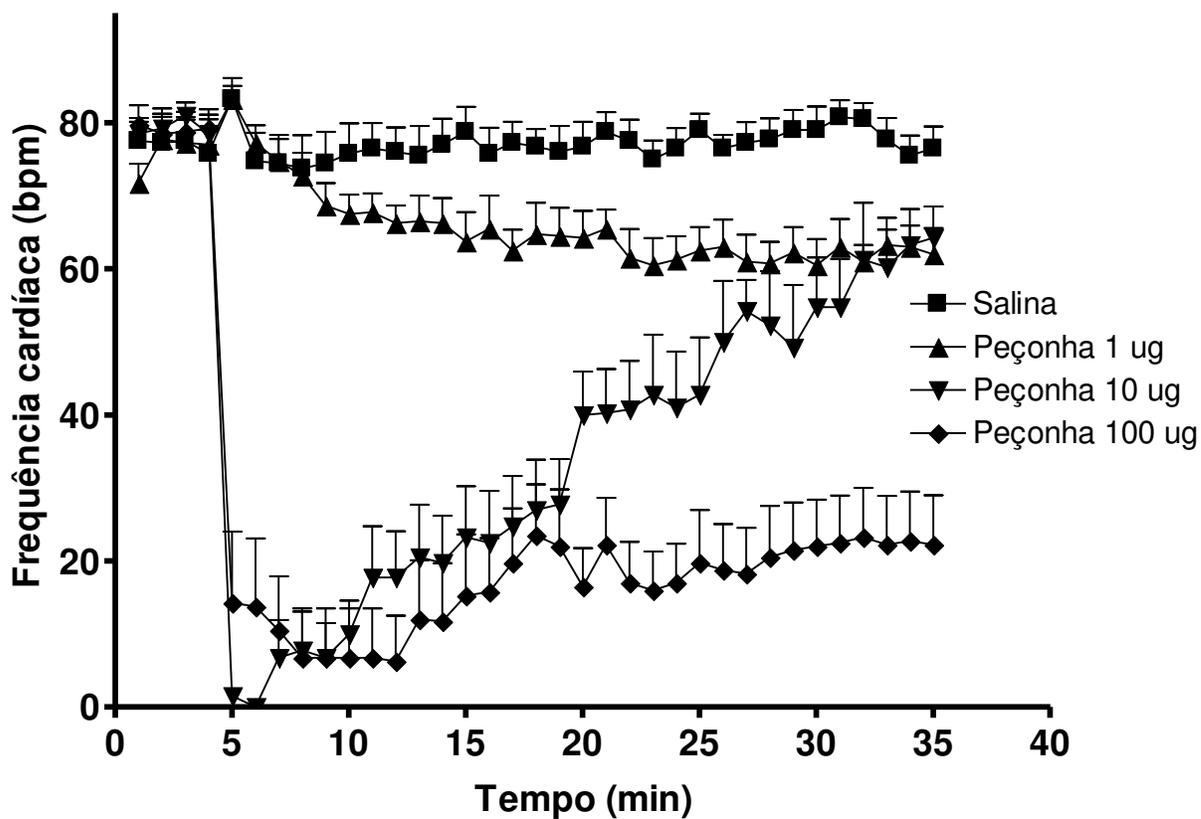


Figura 15. Ação da peçonha de *P. clavata* sobre a frequência cardíaca em coração semi-isolado de barata. Os controles foram incubados com solução salina. Os pontos são a média \pm EPM (n =8).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Composição geral da peçonha de *P. clavata*

Os resultados deste estudo mostram que a peçonha de *P. clavata* é composta principalmente de material peptídico/protéico (~64%), com proteínas de massa molecular de 21 kDa a 116 kDa. Estes achados estão de acordo com peçonhas de outras espécies de formigas, tais como a de *S. invicta* (78), porém nesta peçonha há abundância de proteínas com até ~39 kDa. Na peçonha de *P. triplarinus* predominam mymexinas com ~7 kDa (29). Em peçonhas de outras formigas como a *M. pilosula* observam-se, em gel de eletroforese, diversas bandas de baixa massa molecular e algumas bandas com até 97 kDa. A análise dos componentes de baixa massa revelou a presença de diversos peptídeos denominados pilosulinas (31). Em estudo dos alérgenos desta mesma formiga foram observadas proteínas de 6 a 89 kDa (32). Em *Solenopsis* e *Mirmicaria* são encontrados ainda componentes de baixa massa molecular como alcalóides (46,50,51). Além disso, componentes voláteis foram observados em formigas do gênero *Pachycondyla* (53). Da peçonha de *P. clavata*, apenas a poneratoxina tem sido bem caracterizada (35,37). Um glicofosfolípideo tóxico para insetos e formador de poros na membrana também foi encontrado na peçonha desta espécie (25).

É possível ainda que alguns dos componentes observados no perfil eletroforético sejam contaminantes das células que compõem a membrana do reservatório de peçonha e que sua presença resulta do processo de extração da peçonha ou mesmo de secreção merócrina ou holócrina.

5.2. Atividades fosfolipásica e hemolítica

A atividade fosfolipásica da peçonha de *P. clavata* foi moderada em comparação com peçonhas como a de *S. invicta* e de algumas vespas, que tem alta atividade fosfolipásica (79). A fosfolipase encontrada na peçonha de *S. invicta* é uma das principais responsáveis pelos efeitos de hipersensibilidade em pacientes picados (26,78). Em envenenamentos os efeitos clínicos provocados pelas fosfolipases podem ter intensidades distintas em decorrência da quantidade

de toxina injetada, tendo em vista que há diferenças no tamanho do reservatório de peçonha em diferentes animais (8).

A peçonha de *P. clavata* causou hemólise, assim como peçonhas de outros himenópteros como *Pogonomyrmex barbatus* (80), e vespas de gênero *Vespula* (17), *Vespa orientalis* (19) e *Polistes lanio lanio* (ver Capítulo 2). Entretanto, nos envenenamentos relatados por picadas de tocandeiras (*P. clavata*) não há descrições de hemólise (9). A ausência de hemólise na clínica pode estar relacionado à baixa quantidade de peçonha injetada ou à diferenças na sensibilidade entre espécies. Em envenenamentos maciços por picadas de algumas vespas observa-se rabdomiólise e insuficiência renal aguda (13,14,19) devido à capacidade de fosfolipases e outras toxinas de clivar membranas celulares. Efeitos locais como necrose e hemorragia foram relatados para picadas de formigas (81) e também podem estar relacionados à ação fosfolipásica capaz de provocar lesões na membrana celular. Conforme mostrado aqui, tanto a atividade fosfolipásica quanto a atividade hemolítica da peçonha foram termolábeis, tendo sua atividade abolida pelo aquecimento. O paralelismo observado entre a sensibilidade destas duas atividades ao calor sugere que há relação entre elas. Esta conclusão está de acordo com outros estudos mostrando relação direta entre atividade hemolítica e presença de atividade fosfolipásica em peçonhas de himenópteros (26,82). Entretanto as fosfolipases podem não ser a única classe de moléculas responsáveis por este efeito, pois diversos peptídeos citotóxicos com atividade hemolítica têm sido isolados de peçonhas de himenopteros (33,34,39,42,43).

5.3. Fracionamento da peçonha

O fracionamento por gel filtração resultou em cinco picos, o primeiro dos quais tinha componentes de alta massa molecular; este pico apresentou atividade em íleo isolado e átrio isolado. Piek *et al.* (35), que investigaram os efeitos da peçonha de *P. clavata* em sistema nervoso periférico de barata e músculo liso de mamífero, identificaram três frações tóxicas que bloqueiam a transmissão sináptica em sistema nervoso de inseto. Duas destas toxinas eram agonistas em

músculo liso de mamífero: uma foi caracterizada contendo cininas e a outra fração, mais ativa, foi recromatografada e resultou na purificação de poneratoxina, um peptídeo com 25 aminoácidos.

Os resultados obtidos aqui sugerem que a toxina presente no pico P1 de gel-filtração tem alta massa molecular, não devendo ser, portanto, uma cinina nem a poneratoxina, exceto se houvesse contaminação por conjugação com algum componente de alta massa molecular.

5.4. Ação em íleo isolado de rato

Algun componente de alta massa molecular presente na peçonha de *P. clavata* é responsável pela atividade em íleo isolado, onde produz contração em baixas concentrações. A relevância clínica desta atividade é desconhecida devido à raridade de casos graves de envenenamentos por esta espécie de formiga. Entretanto, há relatos de náusea em indivíduo picados por *Dinoponera gigantea* (9), o que pode resultar da ação de toxinas da peçonha desta formiga no sistema nervoso central.

A toxina presente no pico P1 da peçonha de *P. clavata* causou desensibilização em íleo, conforme mostrado pelos diferentes protocolos usados aqui. Diversas moléculas causam efeito semelhante (83), sendo a ativação colinérgica via receptores muscarínicos uma das vias comuns de desensibilização em íleo. Entretanto, nos experimentos realizados no presente trabalho, a resposta a ACh não foi afetada pela administração sucessiva do pico P1 na mesma tira de íleo, indicando que o mecanismo envolvido na desensibilização pelo pico P1 não envolve a via colinérgica.

Vários estudos têm mostrado que as fosfolipases podem aumentar a força contrátil e causar contratatura em diversos órgãos isolados através da mobilização de Ca^{2+} intracelular; pode também haver uma desensibilização lenta pela ação em outros receptores (84,85). No presente estudo, a atividade fosfolipásica foi encontrada em vários picos cromatográficos, especialmente pico P4 (dados não mostrados), enquanto o efeito em íleo está presente no pico 1. Este achado indica que a atividade fosfolipásica desta peçonha não é responsável pela ação contrátil

no íleo, pois a maioria das fosfolipases descritas têm massa molecular de 12 a 15 kDa (86) e no pico P1 predomina uma toxina de 35-40 kDa. Por outro lado, foi isolada uma serinoprotease, denominada magnvesina, com atividade anticoagulante (87) isolada de peçonha de *Vespa magnifica*, algumas proteases da classe 5 têm massa molecular compatível com a dos componentes presentes no pico P1. Por último, notamos que a atividade fosfolipasica da peçonha foi abolida por aquecimento, enquanto a da toxina presente no pico P1 não foi afetada pelo aquecimento, indicando que toxinas diferentes são responsáveis por estas atividades.

5.5. Ação em átrio direito isolado de rato

Peçonhas de formigas produzem uma variedade de alterações cardiovasculares, incluindo hipotensão (associada freqüentemente com reações de hipersensibilidade à peçonha) e arritmias cardíacas mediadas por enzimas (como PLA₂) e alcalóides; pode haver também a liberação de mediadores endógenos como histamina e eicosanóides (prostaglandinas) (45,66,88). (9) relataram que a picada da falsa tocandira (*D. gigantea*) causa uma variedade de manifestações, incluindo dor, sudorese, náuseas, vômitos, mal estar, taquicardia e linfadenopatia axilar.

Como mostrado aqui, a peçonha de *P. clavata* (0,125-10 µg/ml) produziu contratura atrial (aumento de tensão na linha de base), que foi maior na concentração mais elevada. Esta contratura marcante resultou em uma diminuição secundária da contratilidade atrial e bradicardia. A diminuição da freqüência cardíaca tem sido observada com peçonhas de himenópteros, tais como o da abelha solitária *Pauperata anthophora* (89). Com outros artrópodes, como escorpiões, a bradicardia e diminuição da força contrátil produzidas pela peçonha são mediadas pela estimulação colinérgica, resultando em liberação de acetilcolina (90,91). A contratura marcante tem sido observada em átrio e coração isolados de ratos expostos a peçonhas e toxinas ofídicas (92,93,94,95,96,96), mas poucos estudos têm examinado este efeito em peçonhas de formiga.

A contratatura muscular é geralmente indicativa de distúrbios na homeostase de Ca^{2+} celular (entrada descontrolada de Ca^{2+} extracelular e liberação maciça de Ca^{2+} intracelular). Hirata *et al.* (97) descreveram mastoparanos capazes de regular a liberação de cálcio sarcoplasmático em músculo esquelético. A ectatomina, uma toxina isolada de *Ectatomma tuberculatum*, age na membrana celular formando canais, e age também em canais de cálcio de miocárdio isolado de rato (57). No caso da peçonha de *P. clavata*, a entrada de Ca^{2+} extracelular pode ser mediada pela presença de um potente ativador de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L presentes na peçonha, com o conseqüente influxo de Ca^{2+} , levando à contração pronunciada. Alternativamente, a peçonha pode conter ativadores de canais de cálcio sensíveis a rianodina presentes no retículo sarcoplasmático que levaria à liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, conforme descrito para peçonhas de escorpião (98,99). Adicionalmente, a toxina presente na peçonha poderia provocar a lesão muscular, exercendo uma ação cardiotoxica. O rompimento da integridade da membrana celular de cardiomiócitos pode resultar em distúrbios na homeostase do Ca^{2+} intracelular e na contratatura muscular (100).

Embora não tenha sido identificado o componente da peçonha responsável pela ação no átrio isolado, a constatação de que apenas um pico, o principal componente do qual tinha uma massa molecular de 35-40 kDa, reproduziu os efeitos da peçonha sugere que a toxina envolvida provavelmente não seja a poneratoxina (2756 Da), que afeta a contratilidade muscular, interferindo com a atividade do canal Na^+ (37). No entanto, pelo menos no caso da peçonha total, não podemos excluir a possibilidade de uma ação combinada entre o(s) componente(s) do pico P1 e poneratoxina, com o prolongamento da abertura de canais de Na^+ que poderia aumentar a ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e resultar em maior entrada de cálcio extracelular.

Com concentrações de 0,25 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de peçonha houve um aumento na frequência e força contrátil dos átrios logo após aplicação, antes da contratatura muscular. Este aumento sugere um efeito adrenérgico transitório nos primeiros minutos de incubação com a peçonha bruta. Este efeito provavelmente não foi

observado com 10 µg/ml, pois foi mascarado pela contratura muscular intensa nesta concentração. Quando os picos foram testados, esta contração maior ocorreu no pico P3 e foi abolida por propranolol mostrando que o componente ativo presente no pico P3 age através de receptores β-adrenérgicos, e foi mais persistente do que a resposta transitória vista com o pico P1 antes de contratura. Estes resultados sugerem que a peçonha contém pelo menos dois componentes ativos no tecido atrial: um que produz contratura muscular semelhante aos efeitos da alta concentração da peçonha (pico P1) e outro que produz os efeitos transitórios vistos em concentrações mais baixas de peçonha, com um aumento prolongado da contratilidade muscular, mas relativamente pouca contratura (pico P3).

5.6. Lesão cardíaca

A peçonha de *P. clavata* e o pico P1 causaram uma liberação significativa de CK-MB, um achado sugestivo de lesão da fibra muscular. Esta conclusão foi confirmada por análise histológica que revelou desorganização das fibras musculares e dano celular. No entanto, é improvável que esse dano, que poderá levar à entrada descontrolada de Ca^{2+} extracelular, tenha sido a principal causa da marcante contratura atrial, tendo em vista o rápido início desta contratura. Entretanto, isso não exclua a possibilidade de que o mesmo componente da peçonha seja responsável por ambas as ações. Em apoio a estes achados sobre o dano celular, outros estudos relataram que peçonhas de formiga são citotóxicas em vários tipos de células (27,28,45,101,102). Esta citotoxicidade poderia ser mediada por PLA_2 presente nestas peçonhas (27,103,104,105).

A lesão dos cardiomiócitos sugerida pela liberação de CK-MB foi confirmada pela análise histológica. Nesta análise, verificou-se rompimento dos cardiomiócitos e desorganização das miofibrilas. O pico P1, mesmo após o aquecimento, foi capaz de lesar as membranas celulares. Em envenenamentos maciços por picadas de himenópteros (13,14), relata-se cardiotoxicidade, que pode ser devido à ação direta de toxinas no miocárdio ou indireta, através de aumento nos níveis de K^+ sérico (levando a arritmias cardíacas) após hemólise intravascular maciça.

Em envenenamentos humanos por ponerinas brasileiras não há relatos de lesão cardíaca (9), talvez pela baixa quantidade de peçonha injetada, pela pequena distribuição das toxinas de alta massa molecular presentes no pico P1, ou mesmo pela falta de estudos sobre o assunto. Por outro lado, a persistência destas toxinas no local da picada pode resultar em efeitos locais, tais como necrose e resposta inflamatória.

5.7. Ação em coração semi-isolado de barata

O coração semi-isolado de barata tem sido usado em estudos farmacológicos e toxicológicos. Conforme demonstrado aqui, a peçonha de *P. clavata* causou efeito cronotrópico negativo marcante nesta preparação, dependendo da dose. Piek *et al.* (35) observaram a presença, em peçonha de *P. clavata*, de três frações que bloqueiam a transmissão sináptica central em baratas, sendo que duas delas foram identificadas: um peptídeo (poneratoxina) e uma glicoproteína. Essas toxinas poderiam contribuir para o efeito observado aqui uma vez que o coração de barata tem sua frequência controlada pelo sistema nervoso central. Sendo assim, a queda da frequência cardíaca em coração de barata pode ter sido provocada por atuação da peçonha diretamente sobre o tecido cardíaco ou indiretamente, através de bloqueio do controle neuronal que o sistema nervoso central exerce sobre este órgão.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados acima, concluímos que a peçonha de *P. clavata*:

1. Contém várias proteínas, com predomínio de componentes com massas moleculares de 22,5, 38, 65, e 100 kDa.

2. Possui atividade fosfolipásica e causa hemólise, ambas são mediadas por componente termosensível.

3. Contraí músculo liso não vascular (íleo de rato), e causa dessensibilização da resposta depois de repetidas incubações.

4. Produz contratatura em átrio direito isolado de rato, ação esta que é termoestável.

5. Possui cinco picos principais quando fracionada por gel filtração, sendo que o pico P1 é responsável pela contração de íleo de cobaia e pela toxicidade em átrio isolado.

6. Exibe um efeito cronotrópico negativo em coração semi-isolado de baratas.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Vespidae

A família Vespidae é dividida em cinco subfamílias: Stenogastrinae, Apinae, Eumeninae, Polistinae e Vespinae (106). As subfamílias Vespinae e Polistinae ocorrem no Brasil e contêm a maioria das vespas sociais, que são popularmente denominadas marimbondos. A Figura 1 mostra a relação filogenética entre as subfamílias da família Vespidae baseada em análise de DNA ribossômico.

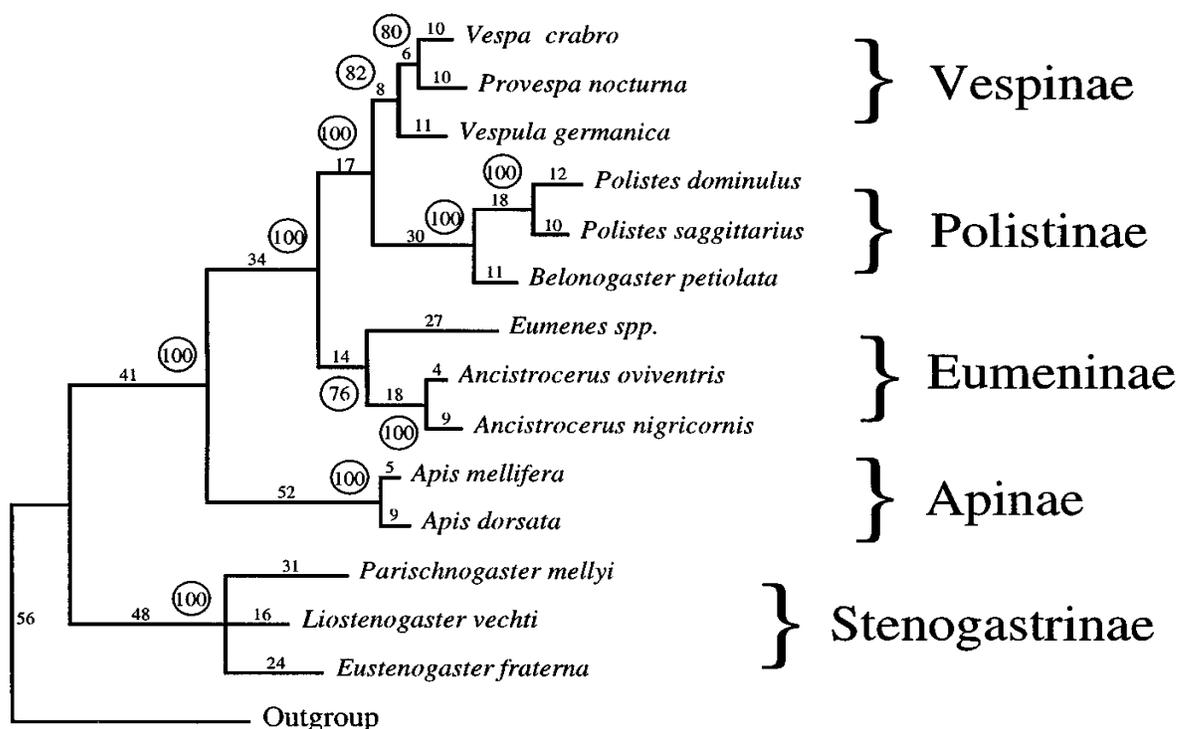


Figura 1. Filogenia da família Vespidae. Os valores acima dos ramos representam os comprimentos dos ramos e os valores circulados representam os valores de bootstrap. Fonte: (106).

1.2. Aparato venenífero de vespas

Algumas espécies de vespídeos não são capazes de ferroar, pois têm um aparato venenífero pouco desenvolvido ou ausente. Por outro lado, várias espécies têm um aparato venenífero desenvolvido sendo, portanto, capazes de

ferroar. O aparato venenífero é considerado um ovipositor modificado. A Figura 2 apresenta esquematicamente o aparato venenífero de vespídeos (107).

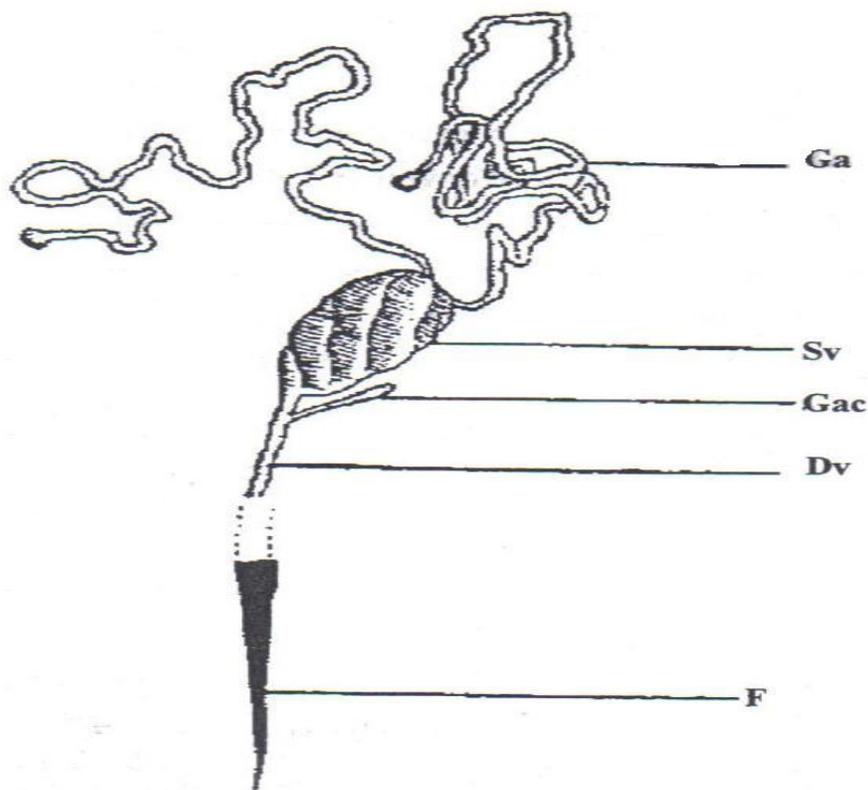


Figura 2. Aparato venenífero de um vespídeo. Ga – glândula anexa, Gac – glândula associada, Dv – ducto de peçonha, F – ferrão e Sv – reservatório de peçonha. Fonte: (107).

1.3. Composição das peçonhas de vespas

Em peçonhas de vespas predominam componentes protéicos como proteínas, peptídeos e glicoproteínas, além de aminoácidos, aminas biogênicas, catecolaminas e alguns componentes voláteis (33,108,110).

1.3.1. Proteínas

As peçonhas de vespídeos contêm diversas proteínas, com ou sem atividade enzimática, e massa molecular variada. Assim, é relatada a presença de esterase, fosfolipase (PLA), fosfatases ácida e alcalina, fosfodiesterase, hialuronidase, lipase, e protease (26,111). Soldatova *et al.* (112) isolaram e sequenciaram uma

fosfolipase A₁ (PLA₁) da peçonha de *Dolichovespula maculata*, mostrando sua similaridade com lipases de mamíferos. Já Ho *et al.* (113) isolaram três toxinas com atividade fosfolipásica da peçonha de *Vespa verutina*, sendo uma delas uma PLA₁. A agelotoxina da peçonha de *Agelaia pallipes pallipes* é uma PLA₂ de 14 kDa que ocorre na forma monomérica (114). Foram purificadas e caracterizadas fosfolipases B da peçonha de *Vespa mandarinia* nas formas α e β com massas moleculares de 29,5 e 26 kDa, respectivamente (115). Haim *et al.* (116) purificaram e caracterizaram uma enzima proteolítica com atividade anticoagulante da peçonha de *Vespa orientalis*. Um estudo proteômico de alérgenos de peçonha *Vespa* identificou hialuronidase e fosfolipases (110). Além destas, têm sido identificadas diversas enzimas em peçonhas de vespas como metaloprotease, serinoprotease, fosfatase acida, arginino-cinase e elastase (87,117,118,119).

1.3.2. Peptídeos

As peçonhas de vespa contêm diversos peptídeos com atividades biológicas como mastoparano C e crabrolina da peçonha de *Vespa crabro*, bombolitinas em peçonha de *Megabombus pennsylvanicus* (120,121), pompilidotoxina em peçonhas de *Anoplius samariensis* e *Batozonellus maculifrons* (122) e tridecapeptídeos bioativos denominados HP-1, HP-2 e HP-3 em peçonha de *Vespa basalis* (123). Um mastoparano tetradecapeptídeo com atividade lítica foi encontrado na peçonha da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado* (124). A atividade hipotensora do mastoparano B de *V. basalis* é potencializada pela substituição de D-aminoácidos (125).

Algumas peçonhas possuem cininas neurotóxicas que contribuem para o bloqueio pré-sináptico em sistema nervoso central de insetos (33). Konno *et al.* (126) identificaram bradycininas em peçonhas de vespas solitárias, a saber: *Megacampsomeris prismatica*, *Campsomeriella annulata annulata* e *Carinoscolia melanosoma fascinata*.

Um peptídeo com propriedades antimicrobianas foi purificado de peçonha de *A. samariensis* (127). Peptídeos com atividade antimicrobiana também foram encontradas em peçonhas de *A. p. pallipes*, além de mastoparanos quimiotáticos

(128). Peptídeos com propriedades antibióticas denominadas dominulina A e B foram identificados na cutícula e na peçonha de *Polistes dominulus* (129). Duas famílias de peptídeos antimicrobianos foram encontradas em peçonha de *Vespa magnífica* (130). Souza *et al.* (131) caracterizaram dois peptídeos com atividade inflamatória. A peçonha de *Polybia paulista* contém dois peptídeos, com N-terminal acetilado, denominados polibina I e II (132). Em síntese, em peçonhas de vespas são encontrados, principalmente, cininas, mastoparanos e protonectinas (133).

1.3.3. Outros componentes: aminoácidos livres, aminas biogênicas, etc.

Além da presença de proteínas e peptídeos, as peçonhas de vespa também contêm aminoácidos livres, tais como GABA, β -alanina, glutamina e glicina, taurina, glutamato, leucina, arginina, tryptofano e histidina (134), aminas biogênicas (histamina, serotonina, dopamina, noradrenalina e adrenalina), poliaminas como a filantotoxina-433 (135), e compostos voláteis como espiroacetatos, amidas e acetatos saturados (109).

1.4. Atividades biológicas

1.4.1. Atividade inseticida

Vários estudos têm demonstrado a atividade inseticida de peçonhas de vespas. A vespa solitária parasitoide *Liris niger* caça grilos e sua peçonha paralisa a presa através do bloqueio da transmissão sináptica, sugerindo a participação de inter-neurônios gigantes no mecanismo desta paralisia (136,137). A peçonha da vespa *Ampulex compressa* causa uma paralisia transitória em baratas através do bloqueio de sinapses colinérgicas centrais (138). Esta vespa injeta a peçonha diretamente dentro do cérebro da presa, provocando um estado letárgico de longa duração (138,139). Ocorre diminuição na atividade de neurônios monoaminérgicos torácicos de animais descerebrados, fenômeno este que pode estar relacionado à mudança de comportamento dos animais picados (140,141). A peçonha de vespa solitária *A. samariensis* induz paralisia não-letal de longa duração em aranhas, sendo que o componente responsável pela paralisia tem massa molecular >4 kDa,

mas também foi identificado um peptídeo bloqueador de canais de potássio e sódio que pode contribuir para esta paralisia de longa duração (142). Existem ainda proteínas capazes de inativar hemócitos de insetos (143).

1.4.2. Atividade antimicrobiana

Diversas peçonhas de vespas possuem atividade antimicrobiana que tem sido atribuída à presença de peptídeos nas mesmas, e.g. em *A. samariensis* (127) e *A. p. pallipes* (144), e os peptídeos dominulina A e B identificados na cutícula e na peçonha de *P. dominulus* (129). Duas famílias de peptídeos antimicrobianos também foram encontradas em peçonha de *V. magnífica* (130).

1.4.3. Citotoxicidade

As peçonhas de *Pteromalus puparum* e *Nasonia vitripennis* são citotóxicas em homócitos e células cultivados de insetos (145,146); este modelo *in vitro* poderia ser útil no desenvolvimento de bioinseticidas (147). No caso da *N. vitripennis*, a citotoxicidade está relacionada à atividade PLA₂ da peçonha (148). Um tetradecapeptídeo com atividade lítica em eritrócitos humanos foi encontrado na peçonha da vespa solitária *A. f. micado* (124).

1.4.4. Neurotoxicidade

As peçonhas de vespa exercem potente atividade neurotóxica em insetos e alguns vertebrados (138,140,149,153). Uma neurotoxina (AvTx8) isolada da peçonha de *Agelaia vicina* age em receptores GABAérgicos (154). Cunha *et al.* (151) sugeriram que o efeito anticonvulsivante da peçonha de *Polybia ignobilis* decorre da interação de componentes da peçonha com receptores GABAérgicos e glutamatérgicos. Efeitos anticonvulsivantes também foram observados com a peçonha de *Polybia occidentalis* (155). 153 relata atividade cataléptica de peçonha desnaturada de *A. vicina* em ratos.

1.4.5. Atividade inflamatória

O envenenamento por vespas frequentemente resulta em dor e edema locais e uma reação inflamatória. Proteínas são alérgenos importantes em peçonhas de vespas (156) 131 caracterizaram dois peptídeos com atividade inflamatória da peçonha de *P. paulista*. A peçonha de *Polistes fucatus* induz edema de pata em ratos (157). No caso do envenenamento por *Polistes lanio lanio*, o edema e aumento da permeabilidade vascular em camundongos induzido pela peçonha desta espécie ocorre primariamente pela ativação de receptores NK₁ pela substância P das fibras C sensoriais, as quais promovem a liberação de histamina por mastócitos (10).

1.5. Mecanismos de ação de toxinas

As peçonhas de vespas solitárias e coloniais contêm agonistas e antagonistas de nAChR (158), além de antagonistas de receptores NMDAR (152). Choi *et al.* (159) estudaram a ligação de filantotoxina-433 e poliaminas relacionadas á nAChR *in vitro*. A peçonha de *A. vicina* interfere na recaptção de GABA e glutamato em sinaptossomos (150). Stromgaard *et al.* (160) mostraram que a potência de enantiômeros de filantotoxina era semelhante em receptores nicotínicos e de glutamato. Pizzo *et al.* (161) relacionaram a atividade de AVTX7 a canais de K⁺ de sinaptossomos. A injeção de Thr6-bradykinin da peçonha de *P. occidentalis* inibe a resposta nociceptiva aguda de ratos (162).

1.6. Aspectos clínicos

Vespas utilizam a peçonha para defesa, portanto quando ocorrem acidentes com envenenamento vespídeos onde os principais efeitos são reações alérgicas incluindo anafilaxia fatal (12,15). Além disso, o envenenamento pode causar a morte por hemólise intravascular, rabdomiólise, insuficiência renal aguda, disfunção hepática e, ocasionalmente, trombocitopenia e coagulopatia (163). Um estudo de três casos de envenenamento por *V. magnífica* revelou a ocorrência de insuficiência renal aguda, hemólise, rabdomiólise, fígado comprometido e oligoanúria (13,14). Adicionalmente ocorre edema local (6) e os mastoparanos da

peçonha podem provocar danos em músculo esquelético (164,165). A trombose aórtica e infarto cerebral são os principais sinais após o envenenamento maciço por picadas de vespas (166). Há relatos de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio, após a picada de vespa. Esses efeitos estão relacionados à ação direta da peçonha sobre o endotélio coronariano e especialmente aos efeitos secundários do sistema imunológico com decréscimo da perfusão coronária e formação de trombos (167,168). Pacientes picados por vespas também podem desenvolver insuficiência renal aguda decorrente de efeitos hematológicos da peçonha com hemólise e rbdomiólise (169,170). Adicionalmente há relatos de encefalites e síndrome compartimental (171,172,173).

1.7. Vespídeos brasileiros

Os vespídeos formam uma parte comum e conspícua da fauna brasileira, especialmente as espécies sociais, e são encontrados em quase todos os ambientes desde a floresta amazônica, mata atlântica, cerrado, caatinga, pantanal e campos sulinos (174). A *P. I. lanio*, conhecida em algumas regiões do Brasil como marimbondo cavalo, constroi ninhos pequenos (cerca de quinze indivíduos) e é comum na região sudeste. É uma vespa grande e se alimenta de néctar e insetos, especialmente lepidópteros (175,176).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Baseado nas considerações acima, os objetivos deste trabalho foram:

1. Investigar a atividade fosfolipásica e hemolítica da peçonha da vespa *P. I. lanio*.
2. Investigar a ação da peçonha de *P. I. lanio* em íleo isolado de cobaia (músculo liso não vascular).
3. Investigar a cardiotoxicidade da peçonha de *P. I. lanio* em átrio direito isolado de rato e coração semi-isolado de barata.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

A acetilcolina, acetonitrila, ácido acético, acrilamida, albumina bovina, azul brilhante de Comassie, glicerol, isofluorano, persulfato de amônia, Superdex 75, sais para soluções fisiológicas, TEMED, Tris, Triton X-100 e kits para quantificação de CK-MB foram obtidos dos fornecedores indicados na seção 3.1. do Capítulo 1. Adicionalmente, foram utilizados os seguintes bloqueadores de canais iônicos: tetrodotoxina (canais de sódio dependentes de voltagem), glibenclamida (canais de potássio dependentes de ATP), 4-aminopiridina (canais de potássio), verapamil (canais de cálcio dependentes de voltagem) e nifedipina (canais de cálcio dependentes de voltagem) comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

3.2. Animais

Foram utilizados ratos e baratas, obtidos conforme descrito no capítulo 1.

3.3. Peçonha de vespa

As vespas (*P. I. lanio*) foram capturadas em torno de ninhos no campus da UNICAMP. Foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo comum e transportadas ao laboratório, onde foram eutanasiadas por congelamento. A identificação das vespas foi realizada através de chaves dicotômicas e foi confirmada por especialista.

Para obtenção da peçonha, as vespas foram descongeladas sob refrigeração e o aparato venenífero foi extraído do abdômen puxando-se o ferrão com uma pinça. Posteriormente, as bolsas de peçonha foram isoladas e pressionadas levemente até expelir seu conteúdo através do duto de peçonha do ferrão; o conteúdo (peçonha) foi coletado utilizando-se um capilar. A peçonha coletada foi liofilizada e congelada para uso nos experimentos.

3.4. Procedimentos experimentais

O conteúdo protéico, a eletroforese, a atividade PLA₂, a atividade hemolítica, a atividade em íleo e átrio isolados de rato e coração isolado de barata e análise estatística dos resultados foram realizados/determinados conforme descrito no Capítulo 1.

3.4.1. Fracionamento por FPLC e HPLC

O fracionamento da peçonha por gel filtração em FPLC foi feito conforme descrito no Capítulo 1.

A cromatografia por HPLC de fase reversa foi realizada usando-se colunas do tipo C18 Luna e Júpiter (5 µm, St 4.6/250, 100 Å e 300 Å, respectivamente; Phenomenex). Para isso, a peçonha ou fração foi aplicada à coluna pré-equilibrada com ácido trifluoroacético (0,1%). As proteínas foram eluídos com gradiente linear (de 0-100%) de acetonitrila 100% em ácido trifluoroacético 0,1%. O perfil de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm. Frações de 1 ml foram coletadas, liofilizadas e testadas quanto à sua atividade biológica.

3.4.2. Coração semi-isolado de barata

Em coração semi-isolado de barata o mecanismo de ação do peptídeo foi investigado usando-se tetrodotoxina (32 µg) (TTX; bloqueador de canais de sódio dependentes de voltagem), glibenclamida (50 µg) ou 4-aminopiridina (32 µg) (bloqueadores de canais de potássio), verapamil (50 µg) ou nifedipina (35 µg) (bloqueadores de canais de cálcio dependentes de voltagem). Neste caso, as preparações foram tratadas com antagonista, 15 min antes da aplicação da peçonha, e as alterações na frequência cardíaca foram registradas durante mais 30 min.

3.4.3. Espectrometria de massas

Foi injetada amostra com 940 ng/uL Peptideo(s) diluído em água com TFA 0,1% utilizando UPLC - MS/MS (nanoAcquity + Synapt HDMS) com nanospray.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Conteúdo protéico e perfil eletroforético

A dosagem protéica mostrou que o conteúdo proteico da peçonha de *P. l. lanio* correspondeu a $82\pm 16\%$ (n=6) do peso seco.

A análise eletroforética mostrou que a peçonha contém proteínas com massa molecular de até 119 kDa, com predominância de componentes de 40 a 46 kDa (Fig. 3).

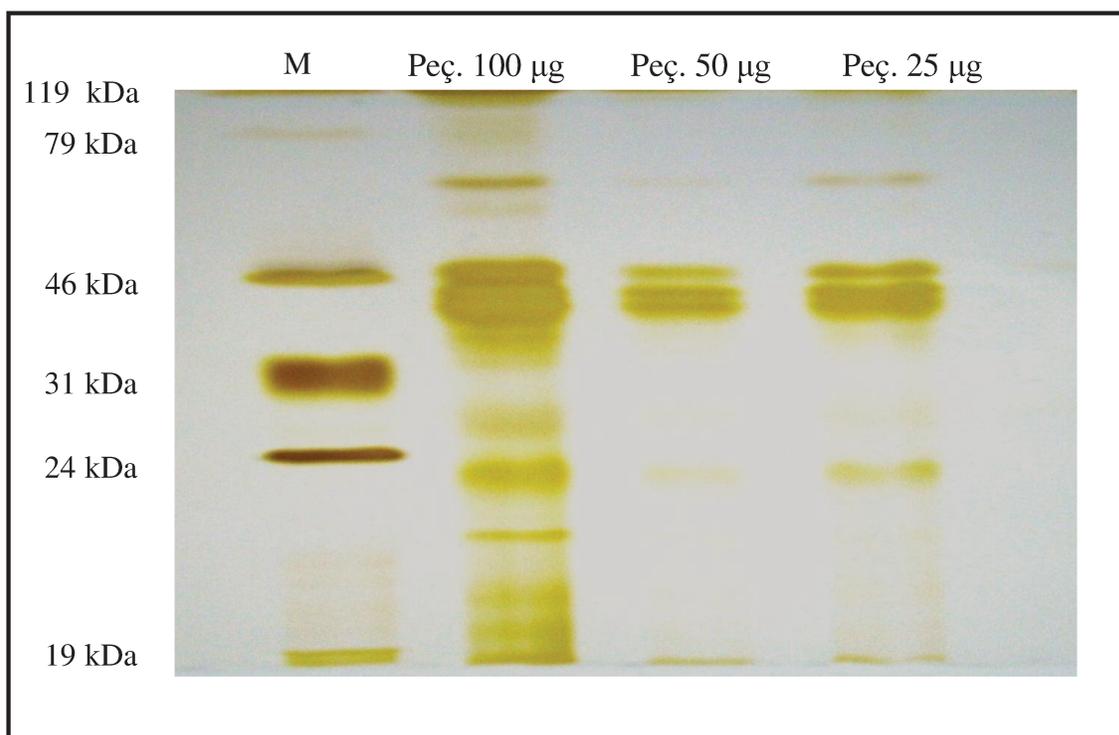


Figura 3: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de peçonha de *P. l. lanio* (25, 50 e 100 µg). Foi usado um gel de acrilamida de 10% e as proteínas foram visualizadas usando coloração por prata. As posições dos marcadores de massa molecular (M, em kDa) estão indicadas à esquerda.

4.2. Atividades fosfolipásica e hemolítica

A Figura 4A mostra a atividade fosfolipásica da peçonha de *P. l. lanio* durante 40 min de incubação a qual foi dependente da concentração. A atividade específica da PLA da peçonha foi de 0,185 U/mg. O aquecimento prévio da peçonha (100°C, 20 min) aboliu a atividade fosfolipásica.

A Figura 4B ilustra a atividade hemolítica da peçonha de *P. I. lanio*, mostrando que é dependente da concentração testada. Conforme visto com a atividade fosfolipásica, o aquecimento prévio também aboliu a atividade hemolítica da peçonha.

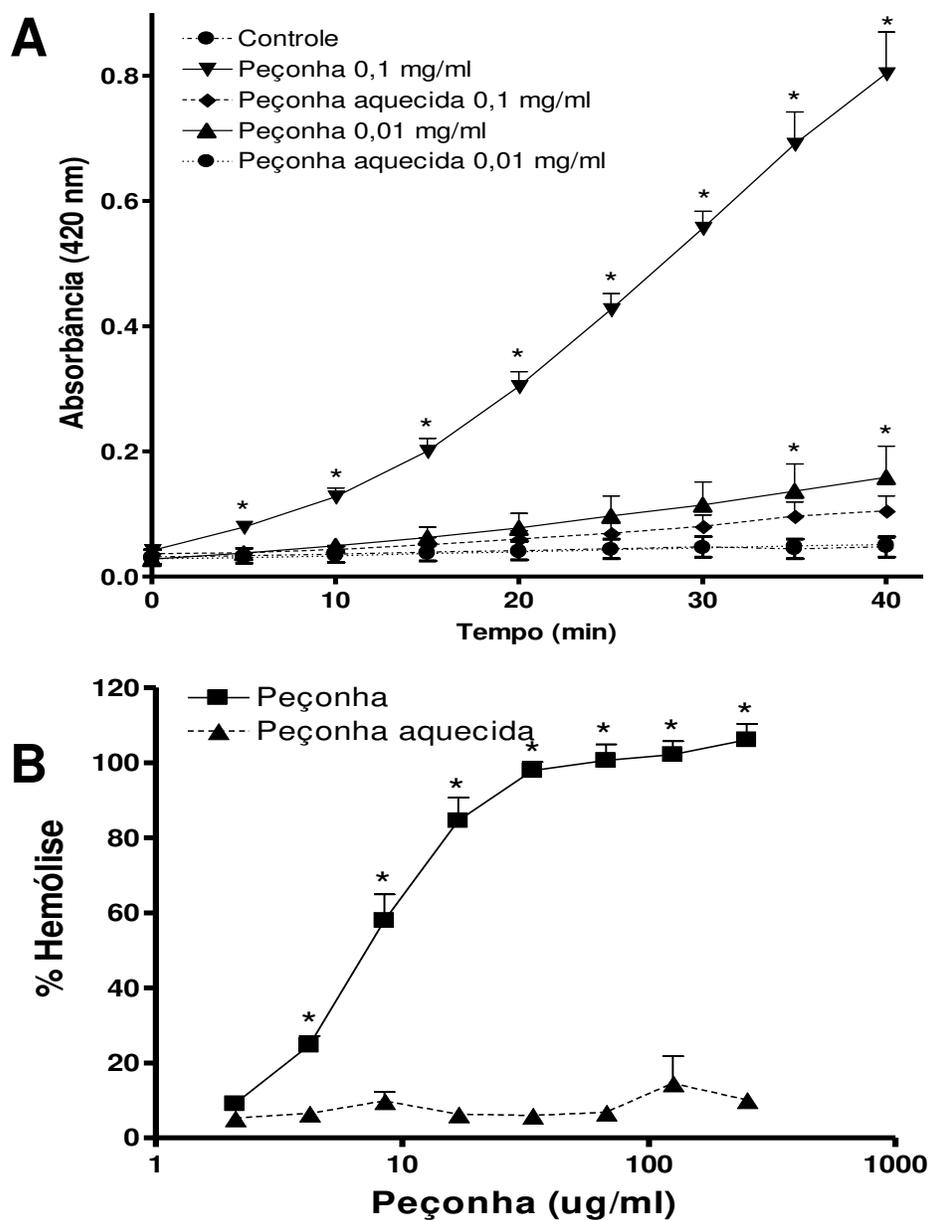
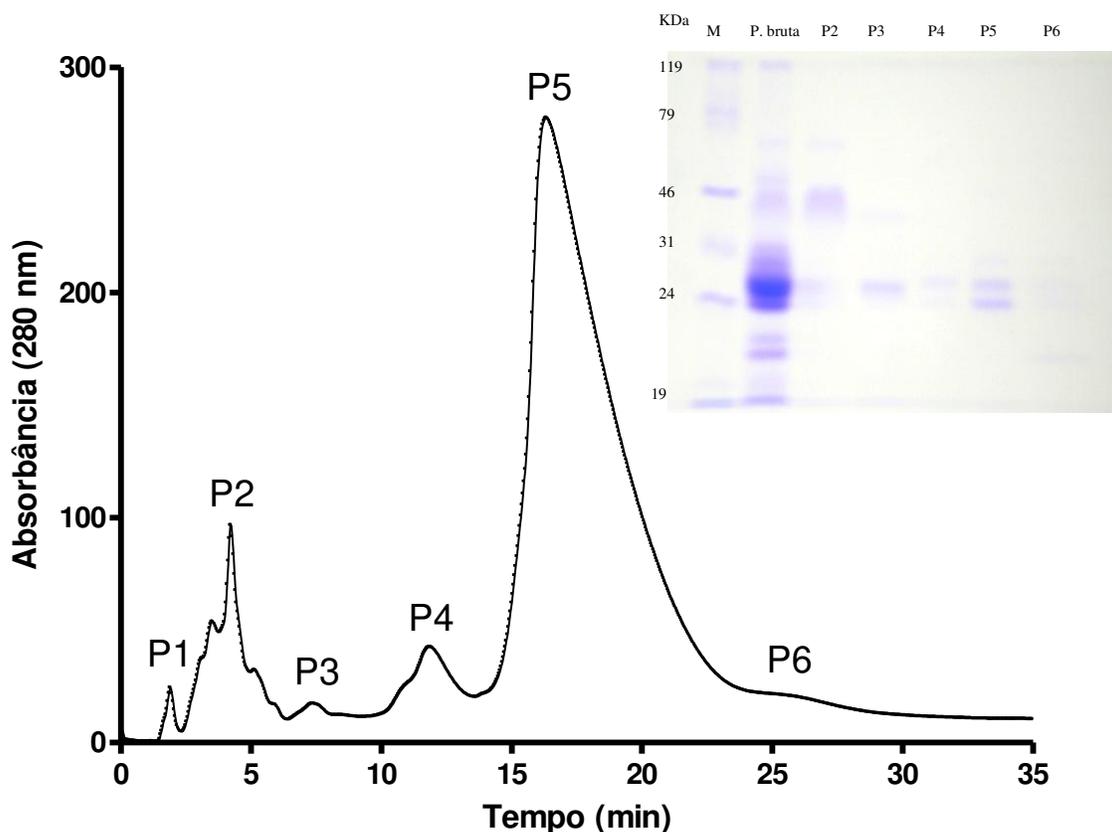


Figura 4: Atividade fosfolipásica (A) e hemolítica (B) da peçonha de *P. I. lanio*. Os pontos são a média \pm EPM de seis experimentos. * $p < 0,05$ comparado com a peçonha aquecida.

4.3. Perfil cromatográfico e purificação da fosfolipase

4.3.1. FPLC

A cromatografia (FPLC) por exclusão molecular da peçonha de *P. l. lanio* resultou em seis picos, com o quinto pico apresentando boa resolução em relação aos demais (Figura 5). Observa-se ainda, no detalhe da Figura 5, o perfil eletroforético dos picos obtidos na comatografia e a predominância de um componente com cerca de 44 kDa no pico 2.



F

figura 5: Perfil de eluição da peçonha de *P. l. lanio* após gel filtração. A peçonha (10 mg) foi dissolvida em 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, e fracionada em coluna de Superdex 75 conforme descrito nos Métodos. Detalhe: Perfil eletroforético do P2 a P6 (20 µg cada) em gel de poliacrilamida de 10%. As bandas de proteína foram detectadas através da coloração com azul brilhante de Coomassie.

Dos picos obtidos por gel filtração (exclusão molecular) a atividade fosfolipásica foi detectada principalmente nos picos 2 e 3 (Figura 6). As atividades específicas dos picos foram: P1 – 0,014 U/mg, P2 – 0,240 U/mg, P3 – 0,549 U/mg, P4 – 0,079 U/mg, P5 – 0,043 U/mg e P6 – 0,096 U/mg. Portanto, o pico com atividade fosfolipásica específica mais alta foi o pico 3, de modo que este pico foi escolhido para a segunda etapa de purificação.

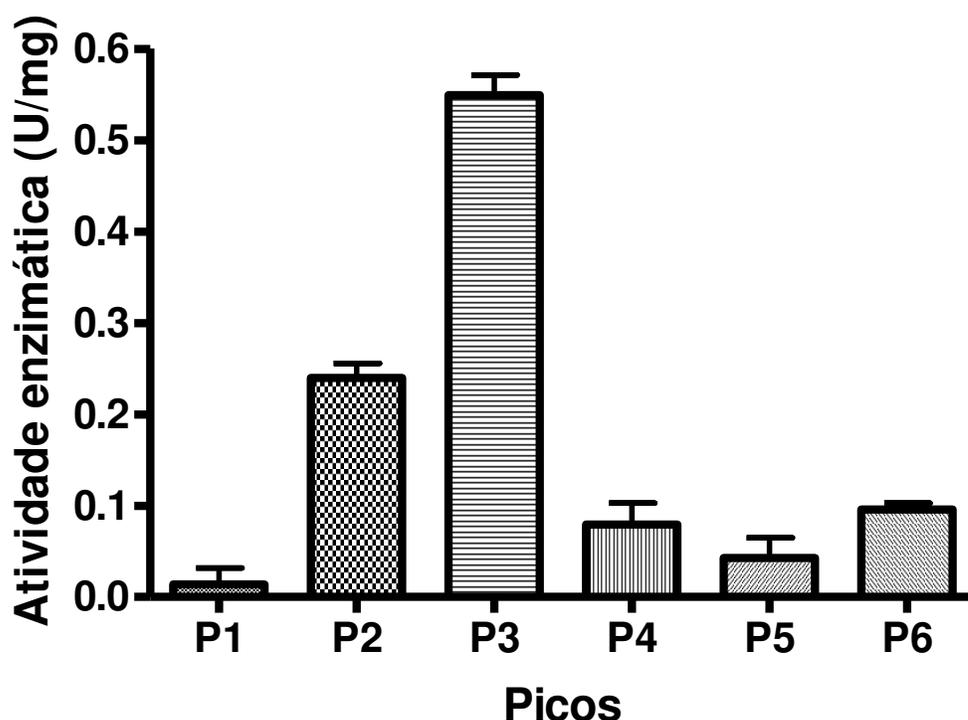


Figura 6: Atividade fosfolipásica específica das frações cromatográficas da peçonha de *P. l. lanio*. A atividade foi determinada conforme descrito no Capítulo 1. As colunas representam a média \pm EPM de 4 determinações.

4.3.2. HPLC

A cromatografia do pico 3 por HPLC em coluna C18 (fase reversa) resultou em cinco picos (Figura 7). A análise eletroforética mostrou que o quarto pico continha uma única banda de aproximadamente 26 kDa. Este pico mostrou atividade fosfolipásica mais acentuada (Figura 8).

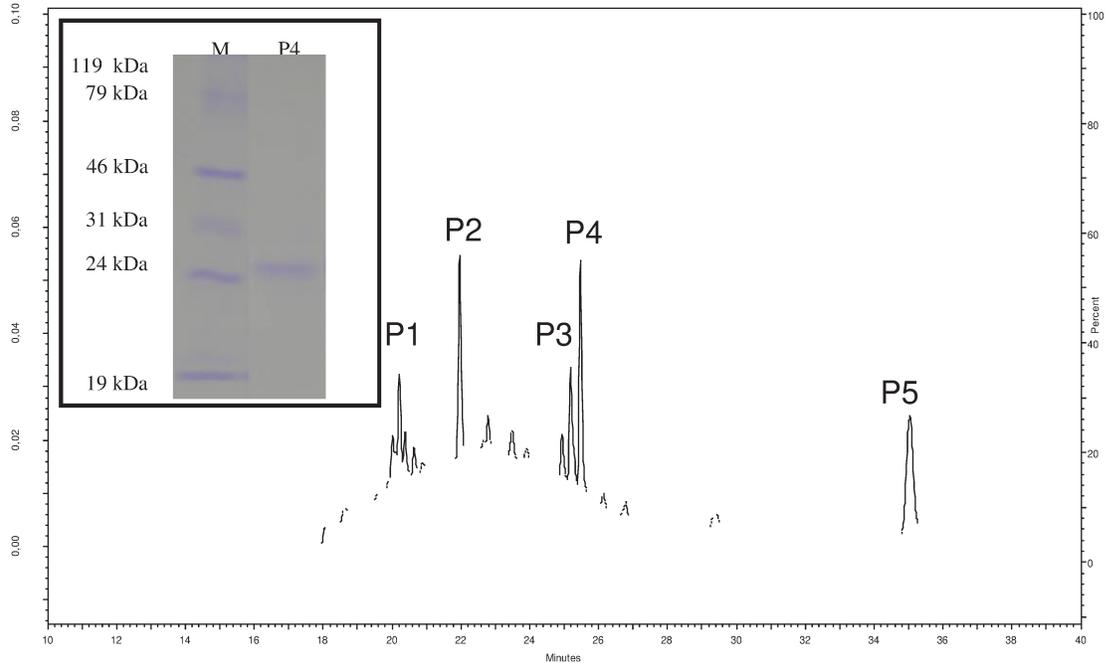


Figura 7: Perfil cromatográfico (RP-HPLC) do pico 3 (gel filtração) da peçonha de *P. l. lanio*. Foi usada uma coluna de fase reversa (coluna Júpiter C18, 5 μ m, 300 Å). A coluna foi eluída com gradiente linear de acetonitrila (0-100%) em 0,1% TFA. Detalhe: Perfil eletroforético do pico 3 (20 μ g) em gel de poliacrilamida de 10%. As bandas de proteína foram detectadas através da coloração com azul brilhante de Coomassie. M – marcadoras de massa molecular.

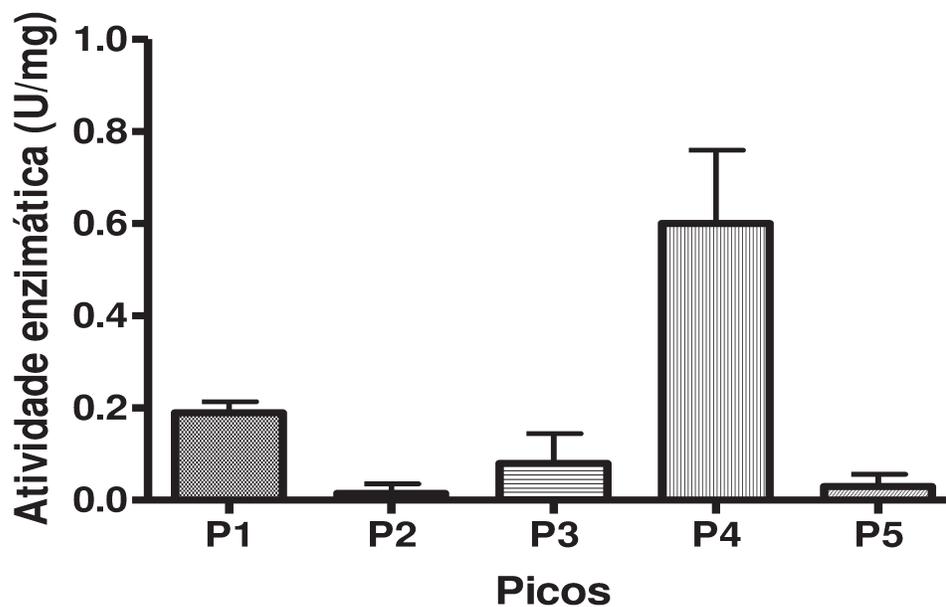


Figura 8: Atividade fosfolipásica específica das frações cromatográficas da peçonha de *P. l. lanio*. A atividade foi determinada conforme descrito no capítulo 1. As colunas representam a média \pm EPM de 2 determinações.

4.4. Íleo e átrio isolados de rato

A Figura 9 mostra que a peçonha de *P. l. lanio* causou contração em íleo isolado de rato que foi dependente da concentração a partir de 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

Em átrio isolado, a peçonha não afetou significativamente a tensão da linha de base (contratura), embora houvesse tendência para contratura na maior concentração testada (Figura 10A). A peçonha atenuou significativamente a atividade contrátil do átrio direito apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ após 45 min de incubação, enquanto não houve alteração na frequência de batimentos (Figura 10B,C). Concentrações maiores que 10 $\mu\text{g/ml}$ não foram testadas devido à quantidade limitada de peçonha disponível.

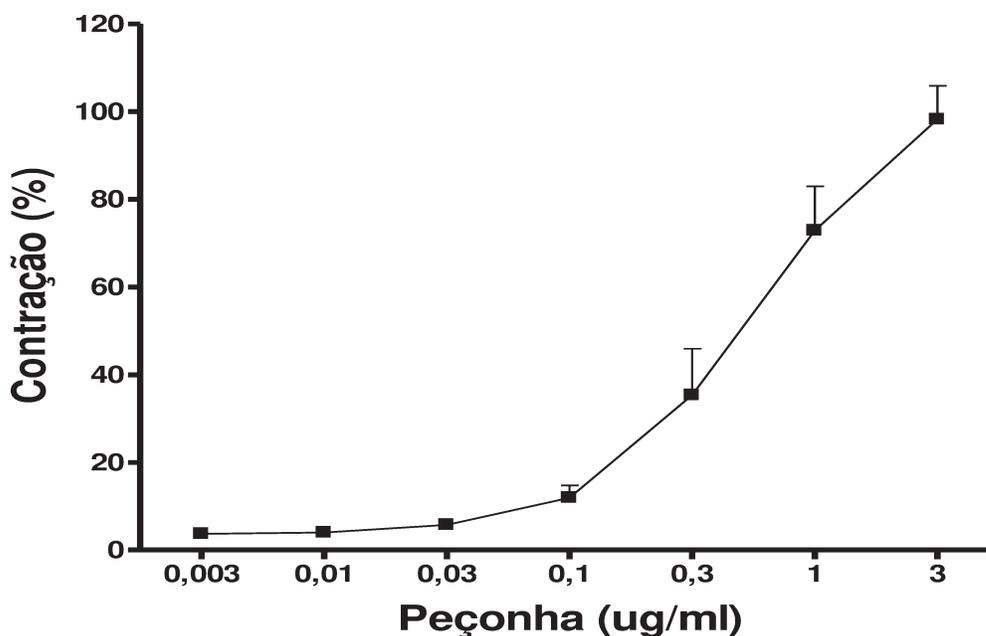


Figura 9: Atividade contrátil da peçonha de *P. l. lanio* em íleo isolado de rato. A contração está representado como porcentagem de resposta induzida por ACh (0,1 μM). Os pontos são a média \pm EPM de seis experimentos.

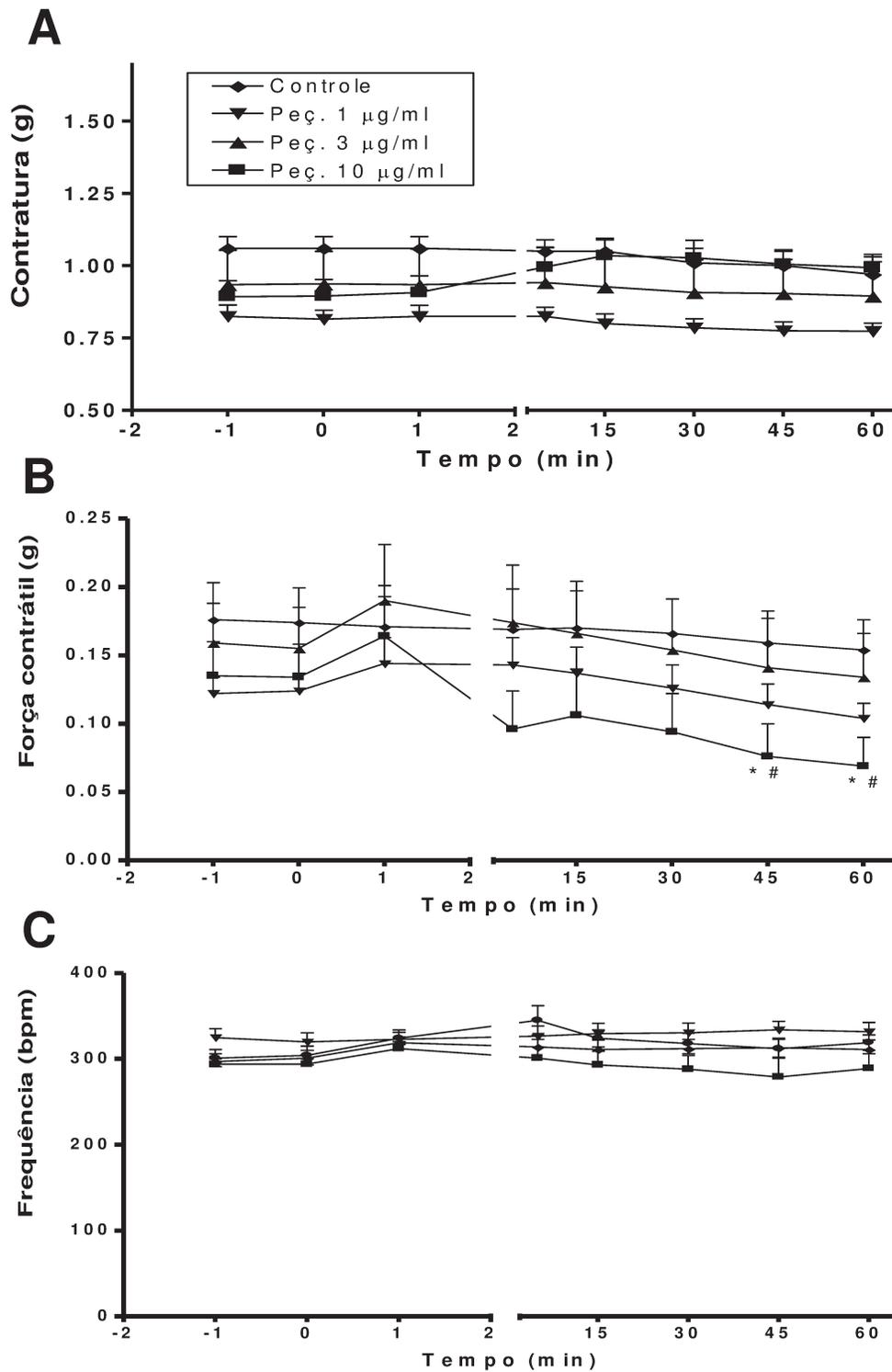


Figura 10: Efeito da peçonha de *P. l. lanio* sobre a contratura (A), contratilidade (B) e frequência de batimentos (C) em átrio direito isolado de rato. Os pontos são a média \pm EPM de seis experimentos. *,# $p < 0,05$ comparado com os valores basais (tempo zero) (#) e com o grupo controle (sem peçonha) (*).

4.5. Coração semi-isolado de barata

Em coração semi-isolado de barata a peçonha de *P. I. lanio* causou bradicardia marcante que foi dependente da quantidade de peçonha testada. Houve redução significativa a partir do primeiro minuto após a aplicação da peçonha (Figura 11A). Esta ação da peçonha não foi afetada pelo aquecimento a 100°C durante 20 min; houve até tendência para aumento da bradicardia (Figura 11B).

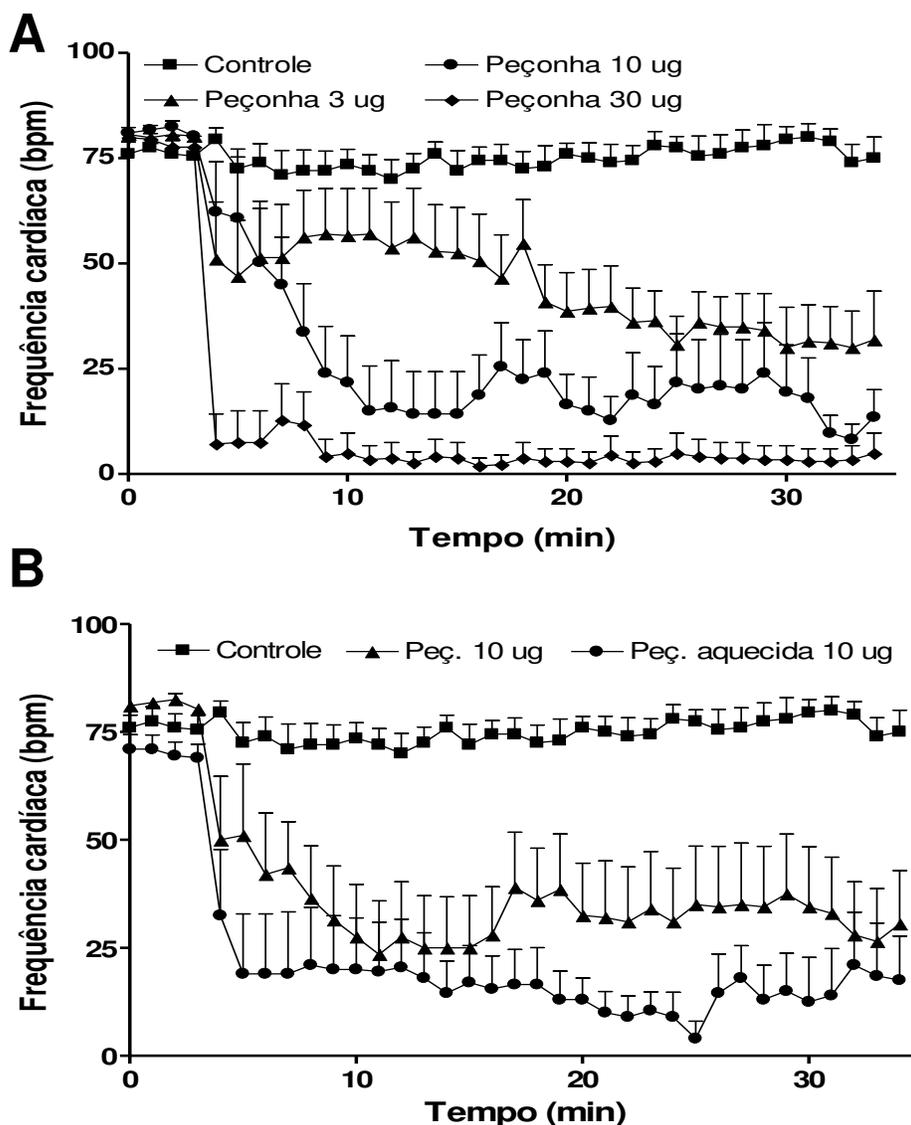


Figura 11: Bradicardia causada pela peçonha de *P. I. lanio* em coração semi-isolado de barata (A). A atividade não foi abolida pelo aquecimento (100°C por 20 min) (B). Os pontos são a média \pm EPM de seis experimentos.

Quando a peçonha de *P. I. lanio* foi fracionada por filtração usando ultra-filtros da Amicon (Millipore) com limite de seleção de 5 kDa, observou-se que a atividade sobre a frequência cardíaca se encontrava principalmente na fração com massa molecular <5 kDa, embora ainda houvesse atividade na fração >5 kDa (Figura 12).

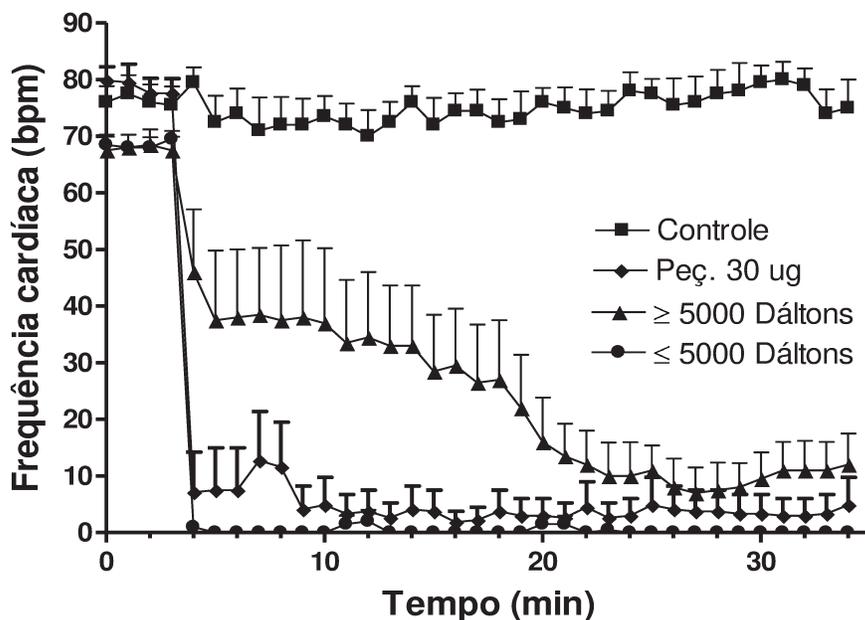


Figura 12: Ação bradicárdica da peçonha de *P. I. lanio* na fração com massa molecular <5 kDa. A bradicardia foi avaliada em coração semi-isolado de barata usando 30 μ g da fração de <5 kDa e >5 kDa. Os pontos são a média \pm EPM de seis experimentos.

A cromatografia por HPLC da fração da peçonha com <5 kDa resultou em seis picos principais (Figura 13), sendo que apenas o pico 4 provocou queda na frequência em coração semi-isolado de barata (Figura 14A,B), com tendência para recuperação, dependendo da quantidade aplicada (Figura 14C).

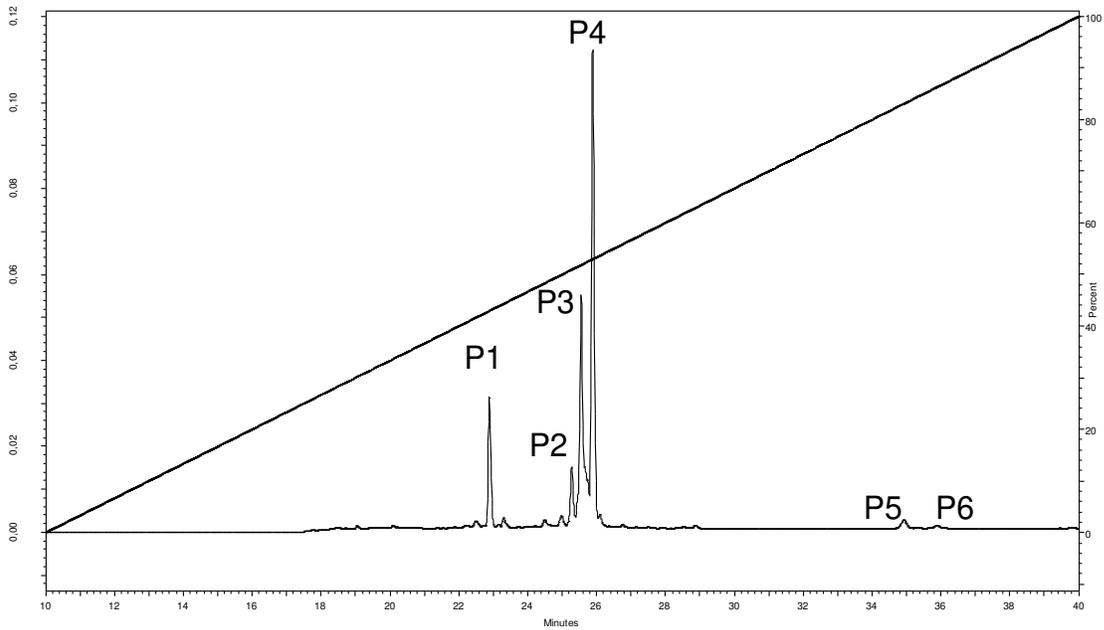


Figura 13: Perfil de eluição (RP-HPLC) dos componentes da peçonha de *P. l. lanio* com massa <5 kDa. O pico 4 apresentou atividade em coração isolado de barata.

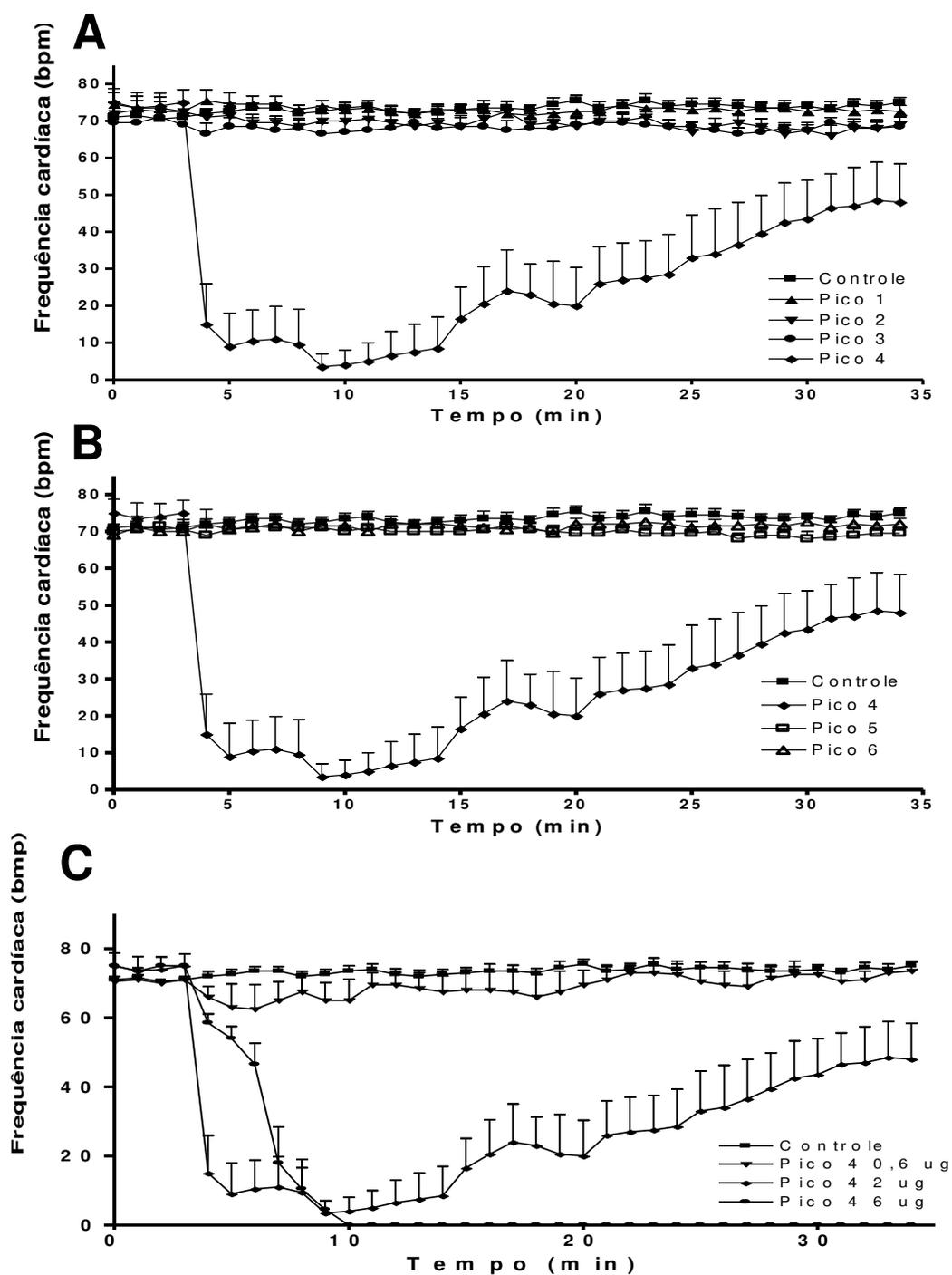


Figura 14: Identificação do pico da peçonha de *P. I. lanio* com atividade bradicárdica em coração semi-isolado de barata (**A,B**). Note que apenas o pico 4 causou bradicardia. Foram testados 2 μ g de cada pico. O painel **C** mostra que a intensidade da bradicardia dependia da quantidade de proteína aplicada. Os pontos são a média \pm EPM de seis experimentos.

Para avaliar os mecanismos envolvidos na bradicardia causada pelo pico quatro investigamos o efeito de diversos bloqueadores de canais iônicos sobre a frequência cardíaca. Foram testados: tetrodotoxina (bloqueador de canais de Na^+ dependentes de voltagem), nifedipina e verapamil (bloqueadores de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem), 4-aminopiridina (bloqueador de canais de K^+ dependentes de voltagem) e glibenclamida (bloqueador de canais de K^+ dependentes de ATP). Destes, apenas a glibenclamida bloqueou a ação do pico 4 (Figura 15).

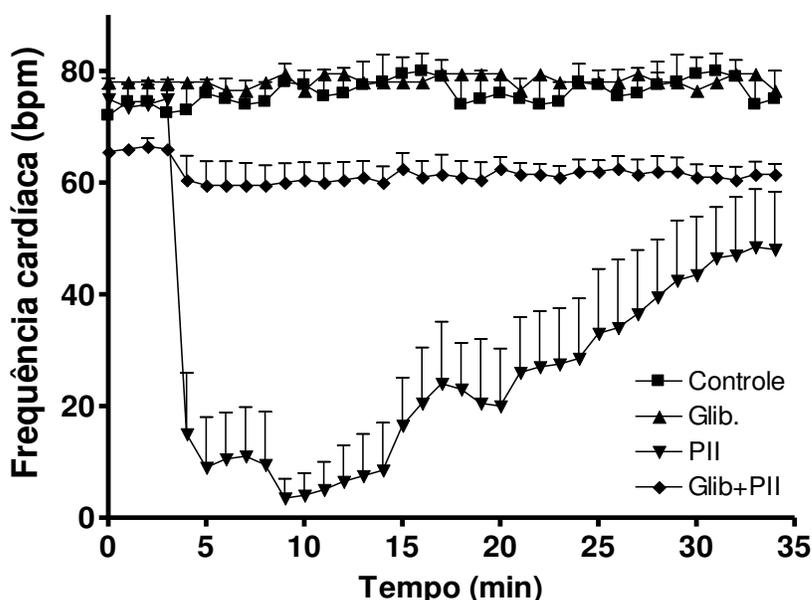


Figura 15: Inibição por glibenclamida (Glib) da bradicardia causada pelo pico 4 da peçonha de *P. I. lanio* em coração semi-isolado de barata. Os pontos são a média \pm EPM de seis experimentos.

4.6. Identificação da toxina por espectrometria de massas

A análise do pico 4 por espectrometria de massas revelou o predomínio de um peptídeo de 2166,222 Da, porém a fração não está pura pois foram observados mais cinco componentes, em menor quantidade, com massas de 1105,143; 1083,586; 3247,794; 2219,177 e 1360,016 Da (Figura 16).

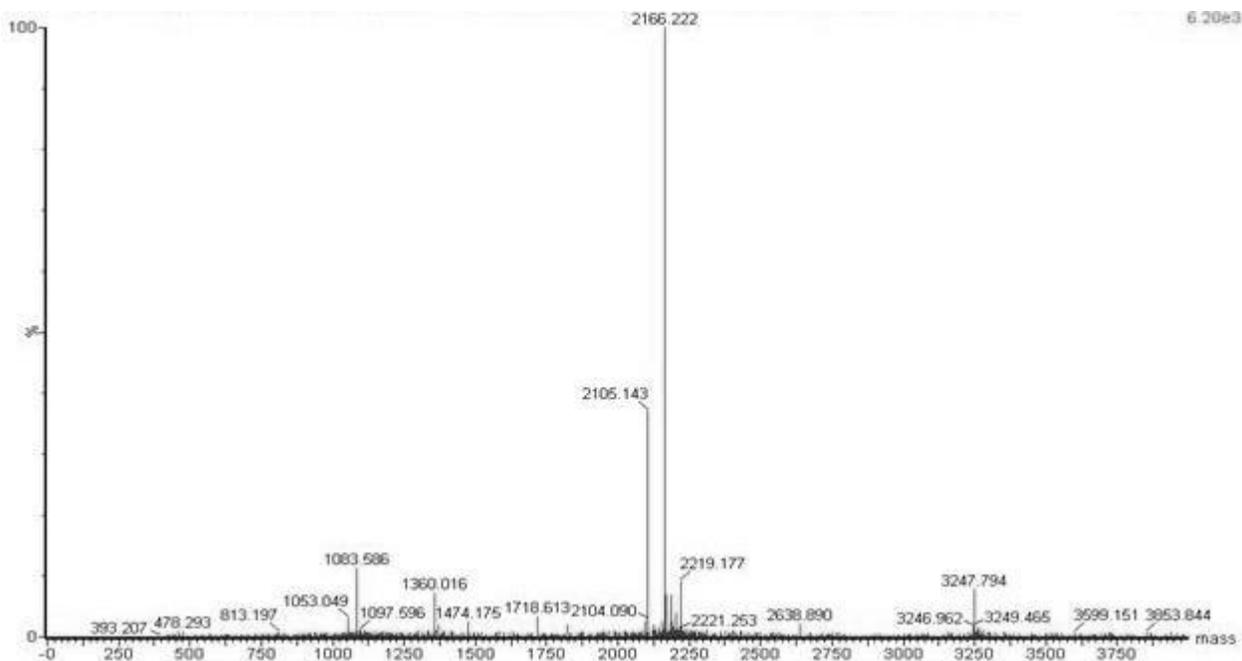


Figura 16: Espectro de massas do pico 4. Note o pico principal em 2166,222 Da. Injeção de 940 ng/uL de peptídeo(s) em água + TFA (0,1%), utilizando-se UPLC - MS/MS (nanoAcquity + Synapt HDMS).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Composição geral da peçonha de *P. I. lanio*

Os resultados apresentados acima mostram que a peçonha de *P. I. lanio* possui alto conteúdo protéico (82%), com predominância de componentes protéicos semelhante a outras peçonhas de vespas (26). A análise eletroforética da peçonha relevou a predominância de componentes com massas moleculares de até 119 kDa. Os perfis eletroforéticos de peçonhas de vespídeos revelam a predominância de algumas proteínas como hialuronidases (110,177), fosfolipases (112,114,166) e alérgenos (110,166). Também têm sido detectados diversos peptídeos e polipeptídeos (120,122,124,127,130,178,179,180) e outros componentes de baixa massa molecular, como aminas e poliaminas.

5.2. Atividades fosfolipásica e hemolítica

As fosfolipases são abundantes em peçonhas de vespas, e várias destas enzimas já foram isoladas e caracterizadas (112,114,166). Estas enzimas são importantes imunógenos e exercem efeitos biológicos, tais como citotoxicidade, miotoxicidade neurotoxicidade, interação com fosfolipídeos da membrana com liberação de segundo mensageiros (ácido araquidônico, prostaglandinas, tromboxanos) (100,110,166,181). Conforme mostrado aqui, a peçonha de *P. I. lanio* também contém alta atividade fosfolipásica, que foi maior que na peçonha da formiga *P. clavata* (ver Capítulo 1). A enzima era termolábil uma vez que o aquecimento aboliu sua atividade enzimática e biológica (hemolítica).

A peçonha de *P. I. lanio* mostrou alta atividade hemolítica, característica também compartilhada com peçonhas de outras vespas (114,121). Os componentes capazes de provocar hemólise incluem fosfolipases (114) e vários peptídeos (120). Em envenenamentos maciços por vespas há hemólise (13), e em animais de laboratório, a hemólise mediada pela PLA₁ de *V. basalis* pode levar ao óbito por hiperpotassemia devido à lise maciça de hemácias (182). Além da hemólise, estas peçonhas também exercem atividade citotóxica e antimicrobiana em diversos outros tipos celulares (83,124,127).

5.3. Fracionamento da peçonha

Usando uma combinação de gel filtração e HPLC de fase reversa foi isolada uma fosfolipase desta peçonha. A cromatografia por exclusão molecular (gel filtração) revelou a presença de atividade fosfolipásica em vários picos, sugerindo a ocorrência de isoformas desta enzima, o que também ocorre em peçonha de outras vespas. Por exemplo, Chwen-Lang *et al.* (80) identificaram três toxinas (~34 kDa) com atividade fosfolipásica na peçonha de *Vespa verutina*. A cromatografia por HPLC resultou em cinco picos, dos quais o maior, que eluiu no meio do gradiente de acetonitrila, apresentou atividade fosfolipásica. A análise eletroforética revelou uma massa molecular de 26 kDa (estimada por SDS-PAGE) para esta proteína.

5.4. Ação em íleo isolado de rato

A peçonha de *P. l. lanio* contraiu íleo isolado de rato em concentrações >0.1 µg/ml. Em peçonha de vespas foram detectados histamina, hidroxitriptamina e diversos outros peptídeos, agem em receptores de bradicinina e serotonina, com atividade em íleo (183, 184, 185). Entretanto as fosfolipases podem provocar efeito em íleo pela interação com fosfolipídeos da membrana liberando ácido araquidônico levando à formação de prostaglandinas e tromboxano (100). É possível que exista diferenças inter-espécie nesta atividade contrátil uma vez que não há relato de distúrbios intestinais em envenenamentos por picadas de vespas em humanos (13).

5.5. Ação em átrio isolado direito de rato

Fisher e Antonios (18) relataram arritmia atrial em paciente após picada de vespa, na ausência de anafilaxia. Porém, no átrio isolado de rato a peçonha de *P. l. lanio* mostrou-se pouco ativa, inclusive quando comparada à peçonha da formiga *P. clavata* (ver Capítulo 1); praticamente não houve alteração na contratatura e na frequência. Na concentração de 10 µg/ml, observou-se inotropismo negativo, provavelmente devido à lesão tecidual causada pela fosfolipase presente na peçonha.

5.6. Ação em coração semi-isolado de barata

Em insetos, as peçonhas de vespas bloqueiam a transmissão neuronal e neuromuscular, inibem hemócitos (136,139,143,147,186,187) e são citotóxicas em vários tipos celulares (83). Ao contrário do átrio isolado de rato, em coração semi-isolado de barata, a peçonha de *P. I. lanio* causou bradicardia acentuada que variou com a quantidade de peçonha aplicada. A peçonha se mostra muito potente, com efeito significativo sendo observada na quantidade de 3 µg. A bradicardia não foi afetado pelo aquecimento da peçonha a 100 °C durante 20 min, indicando que o componente envolvido é termoestável. Tendo em vista que enzimas geralmente são termolábeis enquanto peptídeos e outros componentes de baixa massa molecular geralmente são mais resistentes ao aquecimento, os resultados sugerem que o componente responsável pela bradicardia provavelmente seja um peptídeo ou outra molécula pequena.

Quando a peçonha foi fracionada por ultra-filtração em membrana com limite de filtração de 5 kDa, observou-se que boa parte da atividade bradicárdica ocorreu na fração <5 kDa, confirmando a sugestão acima quanto à massa molecular reduzida da toxina. A cromatografia por RP-HPLC resultou na purificação de um pico capaz de provocar bradicardia em coração semi-isolada de barata. Dos diversos bloqueadores de canais de Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+} testados, apenas glibenclamida (bloqueador de canais de K^{+} dependentes de ATP) bloqueou efetivamente a bradicardia causada pelo peptídeo. Entretanto, pelo modelo experimental usado aqui, não foi possível precisar o local exato de ação da toxina, ou seja, se foi através de uma ação direta sobre células do músculo cardíaco, i.e., cardiotoxicidade, ou uma ação sobre células nervosas que modulam a contratilidade cardíaca em baratas, i.e., neurotoxicidade (188,189). Toxinas que agem em canais de potássio foram detectadas em peçonha de escorpiões e anêmonas (190,191,192,193,194). Um composto sulfúrico volátil, extraído de planta é neurotóxico para inseto agindo através de canais de potássio dependentes de ATP (195).

A alta atividade desta toxina em coração semi-isolada de barata e a ação em canal apontam para um potencial como inseticida (196,197). De fato,

componentes de baixa massa molecular são eficientes no combate a insetos praga e vários peptídeos de peçonhas de vespa (mastoparanos, filantotoxinas, etc) já têm sido investigadas como potenciais inseticidas (120,122,127,129,161, 198).

A espectrometria de massas indicou a predominância de um peptídeo com massa molecular de 2166 Da. Na espectrometria de massas, foram observados seis peptídeos, três deles com a mesma relação massa-carga, porém com massas de 1083, 2166 e 3240 Da, e predomínio do peptídeo de 2166 Da. A hipótese mais plausível para este achado é que o peptídeo de 1080 Da também ocorre na forma dimérica (2160 Da) e trimérica (3240), possivelmente devido a uma ligação estável como consequência de modificações pós-traducionais, pois há relatos de pós-processamento de um polipeptídeo durante a biossíntese de mastoparanos (199,200), ou mesmo clivagem de seqüências repetidas expressas (201).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados acima, concluímos que a peçonha de *P. l. lanio*:

1. Contém proteínas com massas moleculares até 119 kDa, com predomínio de componentes na faixa de 44 e 46 kDa.
2. Apresenta forte atividade fosfolipásica e hemolítica, sendo que ambas são termolábeis.
3. Contraí músculo liso não vascular (íleo isolado de rato), mas tem pouco efeito sobre músculo cardíaco (átrio isolado de rato), exceto na maior concentração onde há um efeito inotrópico negativo.
4. Causa forte bradicardia em coração semi-isolado de barata. Esta atividade é mediada por peptídeos que ativam canais de K^+ dependentes de ATP.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Ruppert EE, Barnes RD. Zoologia dos Invertebrados. 6ª edição. São Paulo: Editora Roca; 1996. 1168p.
2. David LE, Schmidt JO. Insect Defenses, Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predator. Albany: Sany Press; 1990. 730p.
3. Fortunato A, Turillazzi S, Delfino G. Ectal mandibular gland in *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae): ultrastructural modifications over the secretory cycle. J Morphol. 2000;244(1):45-55.
4. Torres JA, Snelling RR, Blum MS, Flournoy RC, Jones TH, Duffield RM. Mandibular gland chemistry of four Caribbean species of *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). Biochem Syst Ecol. 2001;29:673-80.
5. Blum MS, Hermann HR. Venoms and venom apparatuses of the Formicidae: Myrmeciinae, Ponerinae, Doylinae, Pseudomyrmecinae, Myrmicinae and Formicinae. In: Bettini S (org.) Arthropod Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 48. Berlin: Springer Verlag. 1978. 801-69.
6. Steen CJ, Janniger CK, Schutzer SE, Schwartz RA. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. Int J Dermatol. 2005;44(2):91-4.
7. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE-SP) 2006. Acidentes por Animais Peçonhentos; disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/Ac_hi_in.htm.
8. Blum MS. Ant venoms: chemical and pharmacological properties. J Toxicol Toxin Rev. 1992;11:115-64.
9. Haddad Júnior V, Cardoso JLC, Moraes RHP. Case report description of an injury in a human caused by a false tocadira (*Dinoponera gigantea*, Perty, 1833) with a revision on folkloric, pharmacological and clinical aspects of the

- giant ants of the genera *Paraponera* and *Dinoponera* (sub-family Ponerinae). Rev Inst Med Trop S Paulo. 2005;47(4):235-8.
10. Yshii LM, Souza GHMF, Camargo EA, Eberlin MN, Ribela MTCP, Muscará MN, Hyslop S, Costa SKP. Characterization of the mechanisms underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. Toxicon. 2009;53:42-52.
 11. Kawamoto F, Kumada N. Immunochemical and clinical studies of venom from the ant *Pseudomyrmex* sp. In: Tu AT (org.) Handbook of Natural Toxins. Vol 2. Insect Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms. Marcel Dekker: New York; 1984. pp. 243-290.
 12. Severino MG, Campi P, Macchia D, Manfredi M, Turillazzi S, Spadolini I, Bil MB, Bonifazi F. European *Polistes* venom allergy. Allergy. 2006;61:860-3.
 13. Vetter RS, Visscher PK, Camazine S. Mass envenomations by honey bees and wasps. West J Med. 1999;170(4):223-7.
 14. Vikrant S, Pandey D, Machhan, Gupta D, Kaushal S, Grover N. Wasp envenomation-induced acute renal failure: a report of three cases. Nephrology. 2005;10:548-52.
 15. Mingomataj E, Priftanji A, Qirko E, Thai Dinh Q, Fischer A, Peiser C, Groneberg DA. Specific immunotherapy in Albanian patients with anaphylaxis to hymenoptera venoms. BMC Dermatol. 2002;2:11.
 16. Gorska L, Chelminska M, Kuziemski K, Skrzypski M, Niedozytko M, Damps-Konstanska I, Szymanowska A, Siemińska A, Wajda B, Drozdowska A, Jutel M, Jassem E. Analysis of safety, risk factors and pretreatment methods during rush hymenoptera venom immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol. 2008;147(3):241-5.
 17. Bousquet J, Huchard G, Michel FB. Toxic reactions induced by hymenoptera venom. Ann Allergy. 1984;52(5):371-4.

18. Fisher BAC, Antonios TFT. Atrial flutter following a wasp sting. *J Postgrad Med.* 2003;49(3):254-5.
19. Sharma A, Wanchu A, Mahesha V, Sakhuja V, Bambery P, Singh S. Acute tubulo-interstitial nephritis leading to acute renal failure following multiple hornet stings. *BMC Nephrol.* 2006;7:18.
20. Holldobler B, Wilson EO. *The Ants.* Cambridge: Harvard University Press; 1990. 732p.
21. Fourcassié V, Oliveira PS. Foraging ecology of the giant Amazonian ant *Dinoponera gigantea* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae): activity schedule, diet and spatial foraging patterns. *J Nat Hist.* 2002;36:2211-27.
22. Bolton B. *Identification Guide to the Ant Genera of the World.* Cambridge: Harvard University Press; 1994. 222p.
23. Inagaki H, Akagi M, Imai HT, Taylor RW, Wiese MD, Davies NW, Kubo T. Pilosulin 5, a novel histamine-releasing peptide of the Australian ant, *Myrmecia pilosula* (jack jumper ant). *Arch Biochem Biophys.* 2008;477:411-6.
24. Hermann HR, Blum MS, Wheeler JW. 1984. Comparative anatomy and chemistry of the venom apparatus and mandibular glands in *Dinoponera grandis* (Guérin) and *Paraponera clavata* (F.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Ann Entomol Soc Am.* 1984;77:272-9.
25. Pluzhnikov KA, Bocharov DN, Kononova NV, Sukhanov SV, Balashova TA, Arsen'ev AS, Grishin EV. Identification and structural analysis of a glycopospholipid component from the venom of ant *Paraponera clavata*. *Bioorg Khim.* 2006;32(5):530-7.
26. Schmidt JO, Blum MS, Overal WL. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon.* 1986;24(9):907-21.

27. Matuszek MA, Hodgson WC, King RG, Sutherland SK. Some enzymic activities of two Australian ant venoms: a jumper ant *Myrmecia pilosula* and a bulldog ant *Myrmecia pyriformis*. *Toxicon*. 1994;32(12):1543-9.
28. Hink WF, Pappas PW, Jaworski DC. Partial biochemical characterization of venom from the ant *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*. 1994;32(7):763-72.
29. Pan J, Hink WF. Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*. 2000;38:1403-13.
30. Von Sicard NAE, Candy DJ, Anderson M. The biochemical composition of venom from the pavement ant (*Tetramorium caespitum* L.). *Toxicon*. 1989;27(10):1127-33.
31. Wiese MD, Chataway TK, Davies NW, Milne RW, Brown SGA, Gai WP, Heddle RJ. Proteomic analysis of *Myrmecia pilosula* (jack jumper) ant venom. *Toxicon*. 2006;47:208-17.
32. Wiese MD, Brown SGA, Chataway TK, Davies NW, Milne RW, Aulfrey SJ, Heddle RJ. *Myrmecia pilosula* (jack jumper) ant venom: identification of allergens and revised nomenclature. *Allergy*. 2007;62:437-43.
33. Piek T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon*. 1991;29(2):139-49.
34. Orivel J, Dejean A. Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). *Toxicon*. 2001;39:195-201.
35. Piek T, Duval A, Hue B, Karst H, Lapied B, Mantel P, Nakajima T, Pelhate M, Schmidt JO. Poneratoxin, a novel peptide neurotoxin from the venom of the ant, *Paraponera clavata*. *Comp Biochem Physiol C*. 1991;99(3):487-95.

36. Hendrich AB, Mozrzymas JW, Konopinska D, Scuka M. The effect of poneratoxin on neuromuscular transmission in the rat diaphragm. *Cell Mol Biol Lett.* 2002;7:195-202.
37. Duval A, Malecót CO, Pelhate M, Piek T. Poneratoxin, a new toxin from an ant venom, reveals an interconversion between two gating modes of the Na channels in frog skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch.* 1992;420(3-4):239-47.
38. Szolajska E, Poznanski J, Ferber ML, Michalik J, Gout E, Fender P, Bailly I, Dublet B, Chroboczek J. Poneratoxin, a neurotoxin from ant venom. Structure and expression in insect cells and construction of a bio-insecticide. *Eur J Biochem.* 2004;271:2127-36.
39. King MA, Wu QX, Donovan GR, Baldo BA. Flow cytometric analysis of Cell killing by the jumper ant venom peptide pilosulin 1. *Cytometry.* 1998;32:268-73.
40. Donovan GR, Street MD, Tetaz T, Smith AI, Alewood D, Alewood P, Sutherland SK, Baldo BA. Expression of jumper ant (*Myrmecia pilosula*) venom allergens: post-translational processing of allergen gene products. *Biochem Mol Biol Int.* 1996;39(5):877-85.
41. Davies NW, Wiese MD, Brown SGA. Characterisation of major peptides in 'jack jumper' ant venom by mass spectrometry. *Toxicon.* 2004;43:173-83.
42. Zelezetsky I, Pag U, Antcheva N, Sahl HG, Tossia A. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Arch Biochem Biophys.* 2005;434:358-64.
43. Inagaki H, Akagi M, Imai HT, Taylor RW, Kubo T. Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*. *Arch Biochem Biophys.* 2004;428:170-8.

44. Johnson SR, Copello JA, Evans MS, Suarez AV. A biochemical characterization of the major peptides from the venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis* Toxicon. 2010;55:702-10.
45. Matuszek MA, Hodgson WC, Sutherland SK, King RG. Pharmacological studies of jumper ant (*Myrmecia pilosula*) venom: evidence for the presence of histamine, and haemolytic and eicosanoid-releasing factors. Toxicon. 1992;30:1081-91.
46. Jones TH, Voegtle HL, Miras HM, Weatherford RG, Spande TF, Garraffo HM, Daly JW, Davidson DW, Snelling RR. Venom chemistry of the ant *Myrmicaria melanogaster* from Brunei. J Nat Prod. 2007;70:160-8.
47. Kem WR, Wildeboer K, LeFrancois S, Raja M, Marszalec W, Braekman JC. Nicotinic receptor inhibition by *Tetraponera* ant alkaloids. Cell Mol Neurobiol. 2004;24(4):535-51.
48. Jones TH, Zottig VE, Robertson HG, Snelling RR. The venom alkaloids from some African *Monomorium* species. J Chem Ecol. 2003;29(12):2721-7.
49. Deslippe RJ, Yu-Jie G. Venom alkaloids of fire ants in relation to worker size and age. Toxicon. 2000;38:223-32.
50. Chen J, Cantrell CL, Shang HW, Rojas MG. Piperideine alkaloids from the poison gland of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). J Agric Food Chem. 2009;57:3128-33.
51. Chen L, Fadamiro HY. Re-investigation of venom chemistry of *Solenopsis* fire ants. I. Identification of novel alkaloids in *S. richteri*. Toxicon. 2009;53:479-86.
52. Schultz DR, Arnold PI, Wu MC, Lo TM, Volanakis JE, Loos M. Isolation and partial characterization of a polysaccharide in ant venom (*Pseudomyrmex* sp.) that activates the classical complement pathway. Mol Immunol. 1979;16(4):253-64.

53. Nikbakhtzadeh MR, Tirgari S, Fakoorziba MR, Alipour H. Two volatiles from the venom gland of the Samsun ant, *Pachycondyla sennaarensis*. *Toxicon*. 2009;54:80-2.
54. Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Logeon A, Chaffote A, Dejean A, Rossier J. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17823-9.
55. Park J, Kaufmann GF, Bowen JP, Arbiser JL, Janda KD. Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis*. 2008;198:1198-1201.
56. Wu QX, King MA, Donovan GR, Alewood D, Alewood P, Sawyer WH, Baldo BA. Cytotoxicity of pilosulin 1, a peptide from the venom of the jumper ant *Myrmecia pilosula*. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1425:74-80.
57. Pluzhnikov K, Nosyreva E, Shevchenko L, Kokoz Y, Schmalz D, Hucho F, Grishin E. Analysis of ectatomin action on cell membranes. *Eur J Biochem*. 1999;262:501-6.
58. Yi GB, McClendon D, Desai D, Goddard J, Lister A, Moffitt J, Vander Meer RK, deShazo R, Lee KS, Rockhold RW. Fire ant venom alkaloid, isosolenopsin A, a potent and selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Int J Toxicol*. 2003;22(2):81-6.
59. Kim SS, Park HS, Kim HY, Lee SK, Nahm DH. Anaphylaxis caused by the new ant, *Pachycondyla chinensis*: demonstration of specific IgE and IgE-binding components. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(6):1095-9.
60. Yun YY, Ko SH, Park JW, Hong CS. Anaphylaxis to venom of the *Pachycondyla* species ant. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(4):879-82.
61. DeShazo RD, Williams DF, Moak ES. Fire ant attacks on residents in health care facilities: a report of two cases. *Ann Intern Med*. 1999;131:424-9.

62. Sun-Sin Kim MD, Hae-Sim Park MD, Hee-Yeon Kim MD, Soo-Keol Lee MD, Dong-Ho Nahm MD. Anaphylaxis caused by the new ant, *Pachycondyla chinensis*: demonstration of specific IgE and IgE-binding components. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(6):1095-9.
63. Solley GO, Vanderwoude C, Knight GK. Anaphylaxis due to red imported fire ant sting. Med J Aust. 2002;176:521-3.
64. Ciszowski K, Mietka-Ciszowska A. Hymenoptera stings. Przegl Lek. 2007;64(4):282-9.
65. Rodriguez-Acosta A, Reyes-Lugo M. Severe human urticaria produced by ant (*Odontomachus bauri*, Emery 1892) (Hymenoptera: Formicidae) venom. Int J Dermatol. 2002;41(11):801-3.
66. Ellis AK, Day JH. Clinical reactivity to insect stings. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2005;5(4):349-54.
67. Fitzgerald KT, Flood AA. Hymenoptera stings. Clin Tech Small Anim Pract. 2006;21(4):194-204.
68. Rhoades R. Stinging ants. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2001;1(4):343-8.
69. Elahi R. The effect of water on the ground nesting habits of the giant tropical ant, *Paraponera clavata*. J Insect Sci. 2005;5:34.
70. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
71. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;15:680-5.
72. Beghini DG, Toyama MH, Hyslop S, Sodek L, Novello JC, Marangoni S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus*

- durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. J Protein Chem. 2000;19(8):603-7.
73. Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. Characterisation of some pharmacological effects of the venom of *Vipera lebetina*. Toxicon. 2004;43:385-91.
74. Dias L. Alterações cardiovasculares causadas pela peçonha de *Bothrops alternatus*: estudos *in vivo* e *in vitro* [tese]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.
75. Klowden MJ, Vitale AJ, Trumble MJ, Wessan CR, Trumble WR. A bioassay for cobra cardiotoxin activity using semi-isolated cockroach heart. Toxicon. 1992;30:295-301.
76. Predel R, Kellner R, Rapus J, Nachman R, Gäde G. Post-translational modifications of the insect sulfakinins. Eur J Biochem. 1999;263:552-60.
77. Vilaplana L, Maestro JL, Piulachs M-D, Bellés X. Modulation of cardiac rhythm by allostatins in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). J Insect Physiol. 1999;45:1057-64.
78. Hoffman DR, Sakell RH, Schmidt M. Sol i 1, the phospholipase allergen of imported fire ant venom. J Allergy Clin Immunol. 2005;115(3):611-6.
79. Chewn-Lang Ho, Yah-Luen Lin, Shu-Fen Li. Three toxins with phospholipase activity isolated from the yellow-legged hornet (*Vespa verutina*) venom. Toxicon. 1999;37:1015-24.
80. Bernheimer AW, Avigad LS, Schmidt JO. A hemolytic polypeptide from the venom of the red harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. Toxicon. 1980;18(3):271-8.
81. Hibel JA, Clore ER. Prevention and primary care treatment of stings from imported fire ants. Nurse Pract. 1992;17(6):65-8.

82. Tan NH, Ponnudurai G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp Biochem Physiol C*. 1992;103(2):299-302.
83. Griffin MT, Matsui M, Shehnaz D, Ansari KZ, Taketo MM, Manabe T, Ehlert FJ. Muscarinic agonist-mediated heterologous desensitization in isolated ileum requires activation of both muscarinic M₂ and M₃ receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(1):339-49.
84. Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D, Clapham DE. G-protein $\beta\gamma$ -subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A₂. *Nature*. 1989;337(9):557-60.
85. Meyer T, Wellner-Kienitz MC, Biewald A, Bender K, Eickel A, Pott L. Depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by activation of phospholipase C-coupled receptors causes slow inhibition but not desensitization of G protein-gated inward rectifier K₁ current in atrial myocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(8):5650-8.
86. Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A₂. A structural review. *Toxicon*. 1996;34(8):827-41.
87. Hana J, Youa D, Xua X, Hanc W, Lub Y, Laia R, Menga Q. An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*. 2008;51:914-22.
88. Howell G, Butler J, Deshazo RD, Farley JM, Liu HL, Nanayakkara NP, Yates A, Yi GB, Rockhold RW. Cardiodepressant and neurologic actions of *Solenopsis invicta* (imported fire ant) venom alkaloids. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(3):380-6.
89. Rakha M, Russein A, Nabil Z, Zalut S. Electrophysiological effects of the solitary bee '*Anthophora pauperata*' venom on different types of muscles. *Egypt J Biol*. 1999;1:72-81.

90. Couto AS, Moraes-Santos T, Azevedo AD, Almeida AP Freire-Maia L. Effects of toxin Ts- γ , purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom, on the isolated rat atria. *Toxicon*.1992;30(4):339-43.
91. Murthy RK, Dubey AS, Abbas MZ, Haghazari L. Investigations on the role of insulin and scorpion antivenom in scorpion envenoming syndrome. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2003;9(2):202-38.
92. Raina RK, Ng'ang'a JN, Telang BV. Neuromuscular, cardiac and smooth muscle effects of whole venom of *Naja mossambica pallida*. *Agressologie* 1978;19(1):23-27.
93. Harvey AL. Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanisms of action. *J Toxicol - Toxin Rev.* 1985;4:41-69.
94. Alloatti G, Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Pagliaro P, Vono P. The mechanical effects of rhinoceros horned viper (*Bitis nasicornis*) venom on the isolated perfused guinea-pig heart. *Exp Physiol.* 1991;76:611-4.
95. Huang MZ, Wang QC, Liu GF. Effects of an acidic phospholipase A₂ purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. *Toxicon* 1993;31:627-35.
96. Gomes A, De P, Dasgupta SC. Occurrence of a unique protein toxin from the Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon* 2001;39:363-70.
97. Hirata Y, Atsumi M, Ohizumi Y, Nakahata N. Mastoparan binds to glycogen phosphorylase to regulate sarcoplasmic reticular Ca²⁺ release in skeletal muscle. *Biochem J.* 2003;371(1):81-8.
98. Zamudio FZ, Gurrola GB, Areèvalo C, Sreekumar R, Walker JW, Valdivia HH, Possani LD. Primary structure and synthesis of imperatoxinA (IpTx_A), a peptide activator of Ca²⁺ release channels/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 1997;405:385-9.

99. Schwartz EF, Michelle E, Diego-García E, Zamudio FZ, Fuentes O, Possani LD, Valdivia HH. Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *Br J Pharmacol.* 2009;157:392-403.
100. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(18):2897-912.
101. Cavill GWK, Robertson PL, Whitfield FB. Venom and venom apparatus of the bull ant, *Myrmecia gulosa* (Fabr.). *Science.* 1964;146(3640):79-80.
102. Ahn MY, Ryu KS, Lee YW, Kim YS. Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Arch Pharm Res.* 2000;23(5):477-81.
103. Lewis JC, Day AJ, De la Lande IS. Phospholipase A in the venom of the Australian bulldog ant *Myrmecia pyriformis*. *Toxicon.* 1968;6(2):109-12.
104. Hoffman DR, Dove DE, Jacobson RS. Allergens in Hymenoptera venom. XX. Isolation of four allergens from imported fire ant (*Solenopsis invicta*) venom. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;82(5):818-27.
105. Hoffman DR. 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.* 1993;92(5):707-16.
106. Schmitz J, Robin FA, Moritz MS. Molecular phylogeny of vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps. *Mol Phylogenet Evol.* 1998;9(2):183-91.
107. Schoeters E, Billen J. Morphology and ultrastructure of a secretory region enclosed by the venom reservoir in social wasps (Insecta, Hymenoptera). *Zoomorphology.* 1995;115(2):63-71.

108. Belebony RO, Pizzo AB, Fontana AC, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, Dos Santos WF. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur J Pharmacol.* 2004;493(1-3):1-17.
109. Bruschini C, Dani FR, Pieraccini G, Guarna F, Turillazzi S. Volatiles from the venom of five species of paper wasps (*Polistes dominulus*, *P. gallicus*, *P. nimphus*, *P. sulcifer* and *P. olivaceus*). *Toxicon.* 2006;47:812-25.
110. Kolarich D, Loos A, Léonard R, Mach L, Marzban G, Hemmer W, Altmann F. A proteomic study of the major allergens from yellow jacket venoms. *Proteomics.* 2007;7:1615-23.
111. Habermann E. Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science.* 1972;177:314-22.
112. Soldatova L, Kochoumian L, King TP. Sequence similarity of a hornet (*D. maculate*) venom allergen phospholipase A₁ with mammalian lipases. *FEBS Lett.* 1993;320(2):145-9.
113. Ho CL, Lin YL, Li SF. Three toxins with phospholipase activity isolated from the yellow-legged hornet (*Vespa verutina*) venom. *Toxicon.* 1999;37:1015-24.
114. Costa H, Palma MS. Agelotoxin: a phospholipase A₂ from the venom of the neotropical social wasp cassununga (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera-Vespidae). *Toxicon.* 2000;38:1367-79.
115. Abe T, Sugita M, Fujikura T, Hiyoshi J, Akasu M. Giant hornet (*Vespa mandarinia*) venomous phospholipases. The purification, characterization and inhibitory properties by biscoclaurine alkaloids. *Toxicon* 2000;38:1803-16.
116. Haim B, Rimon A, Ishay JS, Rimon S. Purification, characterization and anticoagulant activity of a proteolytic enzyme from *Vespa orientalis* venom *Toxicon.* 1999;37:825-9.

117. Price DRG, Bell HA, Hinchliffe G, Fitches E, Weaver R, Gatehouse JA. A venom metalloproteinase from the parasitic wasp *Eulophus pennicornis* is toxic towards its host, tomato moth (*Lacanobia oleraceae*). *Insect Mol Biol.* 2009;18(2):195-202.
118. Yamamoto T, Arimoto H, Kinumic T, Obad Y, Uemura D. Identification of proteins from venom of the paralytic spider wasp, *Cyphononyx dorsalis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007;37:278-86.
119. Zhu JY, Ye GY, Hu C. Molecular cloning and characterization of acid phosphatase in venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Toxicon.* 2008;51:1391-9.
120. Argiolas A, Pisano J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. *J Biol Chem.* 1984;259(16):10106-11.
121. Argiolas A, Pisano J. Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *J Biol Chem.* 1985;260(3):1437-44.
122. Konno K, Hisada M, Itagaki Y, Naoki H, Kawai H, Miwa A, Yasuhara T, Takayama H. Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(3):612-6.
123. Ho CL, Hwang LL. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. *Biochem J.* 1998;274:453-6.
124. Cabrera MPS, Souza MB, Fontana R, Konno K, Palma MS, Azevedo Jr WF, Neto JR. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *J Peptide Res.* 2004;64:95-103.

125. Ho CL, Shih YP, Wang KT, Yu HM. Enhancing the hypotensive effect and diminishing the cytolytic activity of hornet mastoparan B by D-amino acid substitution. *Toxicon*. 2001;39:1561-6.
126. Konno K, Palma MS, Hitara IY, Juliano MA, Juliano L, Yasuhara T. Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. *Toxicon*. 2002;40:309-12.
127. Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CCB, Naoki H, Itagaki Y, Miwa A, Kawai N, Nakata Y, Yasuhara T, Neto JR, Azevedo Jr WF, Palma MS, Nakajima T. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1550(1):70-80.
128. Mendes MA, Souza BM, Santos LD, Palma MS. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18:636-42.
129. Turillazzi S, Mastrobuoni G, Dani FR, Moneti G, Pieraccini G, La Marca G, Bartolucci G, Perito B, Lambardi D, Cavallini V, Dapporto L. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2006;17:376-83.
130. Xu X, Li J, Lu Q, Yang H, Zhang Y, Lai R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. *Toxicon*. 2006;47:249-53.
131. Souza BM, Marques MR, Tomazela DM, Eberlin MN, Mendes MA, Palma MS. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18:1095-102.

132. Ribeiro SP, Mendes MA, Santos LD, Souza BM, Marquesa MR, Azevedo Jr WF, Palma MS. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 2004;25:2069-78.
133. De-Graaf DC, Aerts M, Danneels E, Devreese B. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics*. 2009;72:145-54.
134. Abe T, Hariya Y, Kawai N, Miwa A. Comparative study of amino acid composition in an extract from hornet venom sacs: high content of neuroactive amino acids in *Vespa*. *Toxicon*. 1989;27(6):683-8.
135. Stromgaard K, Brierley MJ, Andersen K, Slok FA, Mellor IR, Usherwood PNR, Krogsgaard-Larsen P, Jaroszewski JW. Analogues of neuroactive polyamine wasp toxins that lack inner basic sites exhibit enhanced antagonism toward a muscle-type mammalian nicotinic acetylcholine receptor. *J Med Chem*. 1999;42(25):5224-34.
136. Ferber M, Consoulas C, Gnatzy W. Digger wasp versus cricket: immediate actions of the predator's paralytic venom on the CNS of the prey. *J Neurobiol*. 1999;38(3):323-37.
137. Ferber M, Hörner M, Cepok S, Gnatzy W. Digger wasp versus cricket: mechanisms underlying the total paralysis caused by the predator's venom. *J Neurobiol*. 2001;47(3):207-22.
138. Haspel G, Libersat F. Wasp venom blocks central cholinergic synapses to induce transient paralysis in cockroach prey. *J Neurobiol*. 2003;54(4):628-37.
139. Haspel G, Rosenberg LA, Libersat F. Direct injection of venom by a predatory wasp into cockroach brain. *J Neurobiol*. 2003;56(3):287-92.

140. Rosenberg LA, Pflüger HJ, Wegener G, Libersat F. Wasp venom injected into the prey's brain modulates thoracic identified monoaminergic neurons. *J Neurobiol.* 2006;66(2):155-68.
141. Rosenberg LA, Glusman JG, Libersat F. Octopamine partially restores walking in hypokinetic cockroaches stung by the parasitoid wasp *Ampulex compressa*. *J Exp Biol.* 2007;210:4411-7.
142. Hisada M, Satake H, Masuda K, Aoyama M, Murata K, Shinada T, Iwashita T, Ohfuné Y, Nakajima T. Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, *Anoplius samariensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330:1048-54.
143. Zhanga G, Schmidt O, Asgari S. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Develop Comp Immunol.* 2006;30:756-64.
144. Mendes MA, Souza BM, Marques MR, Palma MS. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon.* 2004;44:67-74.
145. Rivers DB, Hink WF, Denlinger DL. Toxicity of the venom from *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward fly hosts, nontarget insects, different developmental stages, and cultured insect cells. *Toxicon.* 1993;31(6):755-65.
146. Abt M, Rivers DB. Characterization of phenoloxidase activity in venom from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Invert Pathol.* 2007;94:108-18.
147. Zhang Z, Yea G, Caia J, Hu C. Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward the hemocytes of their natural hosts, non-target insects and cultured insect cells. *Toxicon.* 2005;46:337-49.

148. Rivers DB, Rocco MM, Frayha AR. Venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* increases Na⁺ influx and activates phospholipase C and phospholipase A₂ dependent signal transduction pathways in cultured insect cells. *Toxicon*. 2002;40(1):9-21.
149. Libersat F. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *J Comp Physiol A*. 2003;189:497-508.
150. Pizzo AB, Fontana ACK, Coutinho-Netto J, Santos WF. Effects of the crude venom of the social wasp *Agelaia vicina* on c-aminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000;14(2):88-94.
151. Cunha AOS, Mortari MR, Oliveira L, Carolino ROG, Coutinho-Netto J, dos Santos WF. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp Biochem Physiol*. 2005;141:50-7.
152. Zalot S, Elbana S, Rizzoli S, Schmidt JO, Mellor IR. Modulation of nicotinic acetylcholine and N-methyl-D-aspartate receptors by some hymenopteran venoms. *Toxicon*. 2005;46:282-90.
153. Oliveira L, Cunha AOS, Mortari MR, Coimbra NC, Dos Santos WF. Cataleptic activity of the denatured venom of the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*. 2006;30:198-203.
154. Oliveira L, Cunha AOS, Mortari MR, Pizzo AB, Miranda A, Coimbra NC, dos Santos WF. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. *Brain Res*. 2005;1031:74-81.
155. Mortari MR, Cunha AOS, Oliveira L, Vieira EB, Gelfuso EA, Coutinho-Netto J, dos Santos WF. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured

- venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007;97:289-95.
156. Monsalve RI, Lu G, King TP. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellow jacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expr Purif*. 1999;16:410-6.
 157. Eno AE. Pharmacological investigation of oedema induced by venom from the wasp *Polistes fuscatus*. *Toxicon*. 1997;35(12):1691-8.
 158. Olsen CA, Mellor IR, Wellendorph P, Usherwood PNR, Witt M, Franzyk H, Jaroszewski JW. Tuning wasp toxin structure for nicotinic receptor antagonism: cyclohexylalanine-containing analogues as potent and voltage-dependent blockers. *Chem Med Chem*. 2006;1:303-5.
 159. Choi SK, Kalivretenos AG, Usherwood PNR, Nakanish K. Labeling studies of photolabile philanthotoxins with nicotinic acetylcholine receptors: mode of interaction between toxin and receptor. *Chem Biol*. 1995;2(1):23-32.
 160. Stromgaard KS, Bjornsdottir I, Andersen K, Brierley MJ, Rizoli S, Eldursi N, Mellor IR, Usherwood PNR, Hansen SH, Krogsgaard-Larsen P, Jaroszewski JW. Solid phase synthesis and biological evaluation of enantiomerically pure wasp toxin analogues PhTX-343 and PhTX-12. *Chirality*. 2000;12(2):93-102.
 161. Pizzo AB, Beleboni RO, Fontana ACK, Ribeiro AM, Miranda A, Coutinho-Netto J, dos Santos WF. Characterization of the actions of AvTx 7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *J Biochem Mol Toxicol*. 2004;18(2):61-8.
 162. Mortari MR, Cunha AO, Carolino RO, Coutinho-Netto J, Tomaz JC, Lopes NP, Coimbra NC, Dos Santos WF. 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*. 2007;151(6):860-9.

163. Paudel B, Paudel K. A study of wasp bites in a tertiary hospital of western Nepal. *Nepal Med Coll J.* 2009;11(1):52-6.
164. Rocha T, Souza BM, Palma MS, Cruz-Höfling MA. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. *Toxicon.* 2007;50:589-99.
165. Rocha T, Leonardo MB, Souza BM, Palma MS, Cruz-Höfling MA. Mastoparan effects in skeletal muscle damage: an ultrastructural view until now concealed. *Microsc Res Tech.* 2008;71:220-9.
166. Yang H, Xua X, Maa D, Zhang K, Laia R. A phospholipase A₁ platelet activator from the wasp venom of *Vespa magnifica* (Smith). *Toxicon.* 2008;51:289-96.
167. Cvetković-Matić D, Asanin M, Matić D, Ivanović B, Simić D, Kalezić N, Stojanov V. Acute myocardial infarction following a hornet sting. *Vojnosanit Pregl.* 2009;66(4):333-7.
168. Valla M, Moulin F, Angioi M, Groben L, Sadoul N, Aliot E. Myocardial infarction in a 45-year-old man following an anaphylactic reaction to a wasp sting. *Int J Cardiol.* 2009;148(3):63-5.
169. Vachvanichsanong P, Dissaneewate P. Acute renal failure following wasp sting in children. *Eur J Pediatr.* 2009;168(8):991-4.
170. Nguyen Xuan BH, Mai HL, Thi TX, Thi MT, Nguyen HN, Rabenou RA. Swarming hornet attacks: shock and acute kidney injury - a large case series from Vietnam. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(4):1146-50.
171. Roy M, Chatterjee M, Deb S, Pandit N. Encephalitis following wasp sting. *Indian J Pediatr.* 2010;77(10):1193-4.

172. Vidhate MR, Sharma P, Verma R, Yadav R. Bilateral cavernous sinus syndrome and bilateral cerebral infarcts: a rare combination after wasp sting. *J Neurol Sci.* 2011;15;(301):104-6.
173. Sawyer JR, Kellum EL, Creek AT, Wood GW 3rd. Acute compartment syndrome of the hand after a wasp sting: a case report. *J Pediatr Orthop B.* 2010;19(1):82-5.
174. Andena SR. Análise filogenética de alguns gêneros de vespas sociais Neotropicais (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007.
175. Prezoto F, Santos-Prezoto HH, Machado VLL, Zanuncio JC. Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) nourishment. *Neotrop Entomol.* 2006;35(5):707-9.
176. Filho RS. Bionomia de *Polistes lanio lanio* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera: Vespidae) no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2007.
177. Kolarich D, Leonard R, Hemmer W, Altmann F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *FEBS J.* 2005;272:5182-90.
178. Rivers DB, Uckan F, Ergin E. Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Arch Insect Biochem Physiol.* 2006;61:24-41.
179. Zhang G, Schmidt O, Asgari S. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41580-5.
180. Yibin G, Jiang Z, Hong Z, Gengfa LV, Liangxi W, Guo W, Yongling L. A synthesized cationic tetradecapeptide from hornet venom kills bacteria and

- neutralizes lipopolysaccharide in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2005;70:209-19.
181. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* 2003;42:885-901.
182. Ho CL, Ko JL. Purification and characterization of a lethal protein with phospholipase A₁ activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom. *Biochim Biophys Acta.* 1988;963(3):414-22.
183. Schachter MJR. The presence of histamine, 5-hydroxytryptamine and a potent, slow-contracting substance in wasp venom. *Br J Pharmacol.* 1954;9:53-8.
184. Schachter M, Thain M. Chemical and pharmacological properties of the potent, slow contracting substance (kinin) in wasp venom. *Br J Pharmacol.* 1954;9:352-9.
185. Picolo G, Hisada M, Moura AB, Machado MFM, Sciani JM, Conceição IM, Melo RL, Oliveira V, Lima-Landman MTR, Cury Y, Konno K, Hayashi MAF. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus* *Biochem Pharmacol.* 2010;79:478-86.
186. Weisel-Eichler AE, Libersat F. Are monoaminergic systems involved in the lethargy induced by a parasitoid wasp in the cockroach prey? *J Comp Physiol A.* 2002;188(4):315-24.
187. Richards EH, Dani MP. Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene. *J Insect Physiol.* 2008;54:1041-9.
188. Miller T, Usherwood PNR. Studies of cardio-regulation in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J Exp Biol.* 1971;54:329-48.

189. Gautier H, Auger J, Legros C, Lapied B. Calcium-activated potassium channels in insect pacemaker neurons as unexpected target site for the novel fumigant dimethyl disulfide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324:149-59.
190. Aneirosa A, García I, Martínez JR, Harvey AL, Anderson AJ, Marshall DL, Engström Å, Hellman U, Karlsson E. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1157(1):86-92.
191. Gendeh GS, Young LC, de Medeiros CLC, Jeyaseelan K, Harvey L, Chung MCM. A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry.* 1997;36(38):11461-71.
192. Lange A, Giller K, Hornig S, France M, Martin-Eauclaire, Pongs O, Becker S, Baldus M. Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state. *Lett Nature.* 2006;440(12):959-62.
193. Diochot S, Lazdunski M. Sea anemone toxins affecting potassium channels. *Prog Mol Subcell Biol.* 2009;46:99-122.
194. Zhu S, Gao B, Aumelas A, Rodríguez MC, Lanz-Mendoza H, Peigneur S, Diego-Garcia E, Martin-Eauclaire M, Tytgat J, Possani LD. MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804(4):872-83.
195. Dugravot S, Grolleau F, Macherel D, Rochetaing A, Hue B, Stankiewicz M, Huignard J, Lapied B. Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K_{ATP} channels. *J Neurophysiol.* 2003;90(1):259-70.
196. Bloomquist JR. Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:163-90.

197. Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *Life Sci.* 2007;59(3):151-62.
198. Souza BM, Silva AVR, Resende VMF, Arcuri HA, Cabrera MPS, Neto JR, Palma MS. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides.* 2009;30(8):1387-95.
199. Xu X, Yang H, Yu H, Li J, Lai R. The mastoparanogen from wasp. *Peptides.* 2006;27:3053-7.
200. Lee VSY, Tu WC, Jinn TR, Peng CC, Lin LJ, Tzen JTC. Molecular cloning of the precursor polypeptide of mastoparan B and its putative processing enzyme, dipeptidyl peptidase IV, from the black-bellied hornet, *Vespa basalis*. *Insect Mol Biol.* 2007;16:231-7.
201. Jones D, Sawickill G, Zniak M. Sequence, structure, and expression of a wasp venom protein with a negatively charged signal peptide and a novel repeating internal structure. *J Biol Chem.* 1992;267(21):14871-8.

ANEXO

Anexo



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1905-1**, sobre "**Atividades biológicas de peçonhas de vespa (*Polistes lanio lanio*) e formiga (*Paraponera clavata*)**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Stephen Hyslop / Delano Anibal da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de julho de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1905-1**, entitled "**Biological activities of wasp (*Polistes lanio lanio*) and ant (*Paraponera clavata*) venoms**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **July 6, 2009**.

Câmpinas, 06 de julho de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva