

Marta Pitalli Buzin

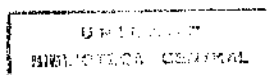
**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS
DO EXTRATO DE SACOS DE VENENO DA
VESPA SOCIAL**

Polistes lanio lanio

Orientador: *Prof. Dr. Stephen Hyslop*

Campinas

1999





Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

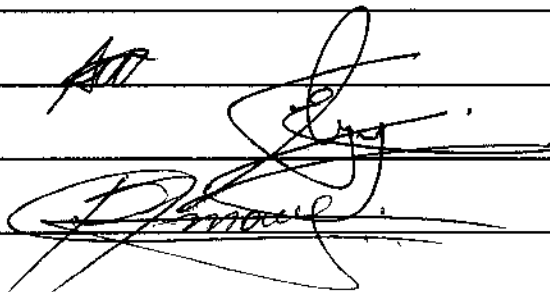
Prof. Dr. Stephen Hyslop

Membros:

1. Prof. Dr. Stephen Hyslop

2. Prof. Dr. Edson Antunes

3. Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Three handwritten signatures are present, corresponding to the three members of the exam board. The first signature is for Prof. Dr. Stephen Hyslop, the second for Prof. Dr. Edson Antunes, and the third for Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 13/12/99

MARTA PITALI BUZIN

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS DO
EXTRATO DE SACOS DE VENENO DA VESPA
SOCIAL *Polistes lanio lanio***

*Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADOR: PROF. DR. STEPHEN HYSLOP

CAMPINAS

1999

UNIDADE	B. C.
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	B988a
V.	
TOMBO	41032
PREÇO	278100
	X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/04/00
N.º CPD	

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

CM-00140589-4

B988a Buzin, Marta Pitali
Atividades enzimáticas e biológicas do extrato de veneno da
vespa social *Polistes lanio lanio* / Marta Pitali Buzin. Campinas, SP
: [s.n.], 1999.

Orientador : Stephen Hyslop
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Hemólise. 2. Fosfolipase. I. Stephen Hyslop. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

*Dedico este trabalho a meus pais,
Angela e Luiz, por toda dedicação,
respeito e inesgotável amor.*

AGRADECIMENTO

Em especial, a meu orientador, Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela amizade e paciência que sempre me dedicou e pela preocupação com minha formação científica.

À Profª. Dra. Júlia Prado-Franceschi, pelos valiosos ensinamentos através dos preciosos 'causos', pela agradável convivência, e pela oportunidade do uso de seu laboratório que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos amigos da Farmaco Luciene, Maura, Pamela e Sr. Alcyr, por sempre compartilharem seus conhecimentos com muita alegria e entusiasmo, pelo companheirismo e amizade tão gratificantes.

Ao técnico José Ilton dos Santos, pela colaboração, paciência e dedicação.

À minha querida amiga Christiane, pela amizade incondicional, pelo imenso carinho, pelo suporte emocional e constante presença em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Ronilson A. Moreno pela amizade, incentivo, apoio e doação de vespas *Polistes lanio lanio* que ajudaram a terminar este trabalho.

À Profª. Dra. Vera Leticia Machado (Departamento de Zoologia Unesp, Rio Claro), pela identificação taxonômica da vespa social *Polistes lanio lanio*.

À minha amiga Cíntia, por todo apoio, compreensão e carinho dedicados a mim.

Às secretárias Gislaine e Rita, do Departamento de Farmacologia pela atenção, paciência e amizade demonstrados em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pelo carinho e amizade sempre dedicados.

Ao técnico de nível superior Gildo B. Leite, pela amizade, paciência, auxílio e conselhos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

E, finalmente, a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e para a minha formação pessoal e profissional.

**“Que todos os nossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembraí-vos de que as grandes proezas da história foram
conquistadas do que parecia impossível.”**

Charles Chaplin

RESUMO.....	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Família Apidae.....	2
1.2. Família Formicidae.....	3
1.3. Família Vespidae.....	5
1.3.1 Taxonomia e distribuição geográfica.....	5
1.3.2. Aparato venenífero.....	5
1.3.3. Composição bioquímica do veneno de vespas.....	7
1.3.4. Farmacologia.....	12
1.3.5. Antigenicidade e aspectos imunológicos.....	16
1.3.6. Biologia de vespas do gênero <i>Polistes</i>	17
1.3.7. Objetivos.....	18
2. RESULTADOS.....	19
2.1. Trabalho enviado para publicação.....	20
3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....	46
4. SUMMARY.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Família Formicidae: Subfamílias e distribuição.....	4
TABELA 2: Cininas nos diversos venenos de vespas.....	10
TABELA 3: Estrutura dos diversos mastoparanos.....	10
TABELA 4: Efeitos farmacológicos de venenos de vespas.....	14

TABELAS NO TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

TABELA T1: Enzymatic activities of <i>P. lanio lanio</i> VSE.....	45
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática do aparato venenífero de vespídeos..... 6

FIGURA 2: Ninho de *Polistes lanio lanio*..... 18

2. FIGURAS NO TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

FIGURA T1: Dose- (A) and time- (B) dependent direct hemolysis of human washed erythrocytes by *Polistes lanio lanio* VSE..... 39

FIGURA T2: Electrophoresis (SDS-PAGE) profile of *P. l. lanio* VSE..... 40

FIGURA T3: Elution profile of *P. l. lanio* VSE on Shephacryl S 200 HR..... 41

FIGURA T4: Human platelet aggregation responses to *P. l. lanio* VSE in PRP (A) and WP (B)..... 42

FIGURA T5: Contractile effect of *P. l. lanio* VSE on rat isolated ileum..... 43

FIGURA T6: Kinins are responsible for the contractile action of *P. l. lanio* VSE on rat isolated ileum..... 44

1. *Resumo*

2. *Abstract*

3. *Introdução*

4. *Objetivos*

5. *Métodos*

6. *Resultados*

7. *Discussão*

8. *Conclusão*

9. *Referências*

10. *Resumo*

11. *Abstract*

12. *Introdução*

13. *Objetivos*

14. *Métodos*

15. *Resultados*

16. *Discussão*

17. *Conclusão*

18. *Referências*

19. *Resumo*

20. *Abstract*

21. *Introdução*

22. *Objetivos*

23. *Métodos*

24. *Resultados*

25. *Discussão*

26. *Conclusão*

27. *Referências*

28. *Resumo*

29. *Abstract*

30. *Introdução*

31. *Objetivos*

32. *Métodos*

33. *Resultados*

34. *Discussão*

35. *Conclusão*

36. *Referências*

37. *Resumo*

38. *Abstract*

39. *Introdução*

40. *Objetivos*

41. *Métodos*

42. *Resultados*

43. *Discussão*

44. *Conclusão*

45. *Referências*

46. *Resumo*

47. *Abstract*

48. *Introdução*

49. *Objetivos*

50. *Métodos*

51. *Resultados*

52. *Discussão*

53. *Conclusão*

54. *Referências*

55. *Resumo*

56. *Abstract*

57. *Introdução*

58. *Objetivos*

59. *Métodos*

60. *Resultados*

61. *Discussão*

62. *Conclusão*

63. *Referências*

64. *Resumo*

65. *Abstract*

66. *Introdução*

67. *Objetivos*

68. *Métodos*

69. *Resultados*

70. *Discussão*

71. *Conclusão*

72. *Referências*

73. *Resumo*

74. *Abstract*

75. *Introdução*

76. *Objetivos*

77. *Métodos*

78. *Resultados*

79. *Discussão*

80. *Conclusão*

81. *Referências*

82. *Resumo*

83. *Abstract*

84. *Introdução*

85. *Objetivos*

86. *Métodos*

87. *Resultados*

88. *Discussão*

89. *Conclusão*

90. *Referências*

91. *Resumo*

92. *Abstract*

93. *Introdução*

94. *Objetivos*

95. *Métodos*

96. *Resultados*

97. *Discussão*

98. *Conclusão*

99. *Referências*

100. *Resumo*

101. *Abstract*

102. *Introdução*

103. *Objetivos*

104. *Métodos*

105. *Resultados*

106. *Discussão*

107. *Conclusão*

108. *Referências*

109. *Resumo*

110. *Abstract*

111. *Introdução*

112. *Objetivos*

113. *Métodos*

114. *Resultados*

115. *Discussão*

116. *Conclusão*

117. *Referências*

118. *Resumo*

119. *Abstract*

120. *Introdução*

121. *Objetivos*

122. *Métodos*

123. *Resultados*

124. *Discussão*

125. *Conclusão*

126. *Referências*

127. *Resumo*

128. *Abstract*

129. *Introdução*

130. *Objetivos*

131. *Métodos*

132. *Resultados*

133. *Discussão*

134. *Conclusão*

135. *Referências*

136. *Resumo*

137. *Abstract*

138. *Introdução*

139. *Objetivos*

140. *Métodos*

141. *Resultados*

142. *Discussão*

143. *Conclusão*

144. *Referências*

145. *Resumo*

146. *Abstract*

147. *Introdução*

148. *Objetivos*

149. *Métodos*

150. *Resultados*

151. *Discussão*

152. *Conclusão*

153. *Referências*

154. *Resumo*

155. *Abstract*

156. *Introdução*

157. *Objetivos*

158. *Métodos*

159. *Resultados*

160. *Discussão*

161. *Conclusão*

162. *Referências*

163. *Resumo*

164. *Abstract*

165. *Introdução*

166. *Objetivos*

167. *Métodos*

168. *Resultados*

169. *Discussão*

170. *Conclusão*

171. *Referências*

172. *Resumo*

173. *Abstract*

174. *Introdução*

175. *Objetivos*

176. *Métodos*

177. *Resultados*

178. *Discussão*

179. *Conclusão*

180. *Referências*

181. *Resumo*

182. *Abstract*

183. *Introdução*

184. *Objetivos*

185. *Métodos*

186. *Resultados*

187. *Discussão*

188. *Conclusão*

189. *Referências*

190. *Resumo*

191. *Abstract*

192. *Introdução*

193. *Objetivos*

194. *Métodos*

195. *Resultados*

196. *Discussão*

197. *Conclusão*

198. *Referências*

199. *Resumo*

200. *Abstract*

201. *Introdução*

202. *Objetivos*

203. *Métodos*

204. *Resultados*

205. *Discussão*

206. *Conclusão*

207. *Referências*

208. *Resumo*

209. *Abstract*

210. *Introdução*

211. *Objetivos*

212. *Métodos*

213. *Resultados*

214. *Discussão*

215. *Conclusão*

216. *Referências*

217. *Resumo*

218. *Abstract*

219. *Introdução*

220. *Objetivos*

221. *Métodos*

222. *Resultados*

223. *Discussão*

224. *Conclusão*

225. *Referências*

226. *Resumo*

227. *Abstract*

228. *Introdução*

229. *Objetivos*

230. *Métodos*

231. *Resultados*

232. *Discussão*

233. *Conclusão*

234. *Referências*

235. *Resumo*

236. *Abstract*

237. *Introdução*

238. *Objetivos*

239. *Métodos*

240. *Resultados*

241. *Discussão*

242. *Conclusão*

243. *Referências*

244. *Resumo*

245. *Abstract*

246. *Introdução*

247. *Objetivos*

248. *Métodos*

249. *Resultados*

250. *Discussão*

251. *Conclusão*

252. *Referências*

253. *Resumo*

254. *Abstract*

255. *Introdução*

256. *Objetivos*

257. *Métodos*

258. *Resultados*

259. *Discussão*

260. *Conclusão*

261. *Referências*

262. *Resumo*

263. *Abstract*

264. *Introdução*

265. *Objetivos*

266. *Métodos*

267. *Resultados*

268. *Discussão*

269. *Conclusão*

270. *Referências*

271. *Resumo*

272. *Abstract*

273. *Introdução*

274. *Objetivos*

275. *Métodos*

276. *Resultados*

277. *Discussão*

278. *Conclusão*

279. *Referências*

280. *Resumo*

281. *Abstract*

282. *Introdução*

283. *Objetivos*

284. *Métodos*

285. *Resultados*

286. *Discussão*

287. *Conclusão*

288. *Referências*

289. *Resumo*

290. *Abstract*

291. *Introdução*

292. *Objetivos*

293. *Métodos*

294. *Resultados*

295. *Discussão*

296. *Conclusão*

297. *Referências*

298. *Resumo*

299. *Abstract*

300. *Introdução*

301. *Objetivos*

302. *Métodos*

303. *Resultados*

304. *Discussão*

305. *Conclusão*

306. *Referências*

307. *Resumo*

308. *Abstract*

309. *Introdução*

310. *Objetivos*

311. *Métodos*

312. *Resultados*

313. *Discussão*

314. *Conclusão*

315. *Referências*

316. *Resumo*

317. *Abstract*

318. *Introdução*

319. *Objetivos*

320. *Métodos*

321. *Resultados*

322. *Discussão*

323. *Conclusão*

324. *Referências*

325. *Resumo*

326. *Abstract*

327. *Introdução*

328. *Objetivos*

329. *Métodos*

330. *Resultados*

331. *Discussão*

332. *Conclusão*

333. *Referências*

334. *Resumo*

335. *Abstract*

336. *Introdução*

337. *Objetivos*

338. *Métodos*

339. *Resultados*

340. *Discussão*

341. *Conclusão*

342. *Referências*

343. *Resumo*

344. *Abstract*

345. *Introdução*

346. *Objetivos*

347. *Métodos*

348. *Resultados*

349. *Discussão*

350. *Conclusão*

351. *Referências*

352. *Resumo*

353. *Abstract*

354. *Introdução*

355. *Objetivos*

356. *Métodos*

357. *Resultados*

358. *Discussão*

359. *Conclusão*

360. *Referências*

361. *Resumo*

362. *Abstract*

363. *Introdução*

364. *Objetivos*

365. *Métodos*

366. *Resultados*

367. *Discussão*

368. *Conclusão*

369. *Referências*

370. *Resumo*

371. *Abstract*

372. *Introdução*

373. *Objetivos*

374. *Métodos*

375. *Resultados*

376. *Discussão*

377. *Conclusão*

378. *Referências*

379. *Resumo*

380. *Abstract*

381. *Introdução*

382. *Objetivos*

383. *Métodos*

384. *Resultados*

385. *Discussão*

386. *Conclusão*

387. *Referências*

388. *Resumo*

389. *Abstract*

390. *Introdução*

391. *Objetivos*

392. *Métodos*

393. *Resultados*

394. *Discussão*

395. *Conclusão*

396. *Referências*

397. *Resumo*

398. *Abstract*

399. *Introdução*

400. *Objetivos*

401. *Métodos*

402. *Resultados*

403. *Discussão*

404. *Conclusão*

405. *Referências*

406. *Resumo*

407. *Abstract*

408. *Introdução*

409. *Objetivos*

410. *Métodos*

411. *Resultados*

412. *Discussão*

413. *Conclusão*

414. *Referências*

415. *Resumo*

416. *Abstract*

417. *Introdução*

418. *Objetivos*

419. *Métodos*

420. *Resultados*

421. *Discussão*

422. *Conclusão*

423. *Referências*

424. *Resumo*

425. *Abstract*

426. *Introdução*

427. *Objetivos*

428. *Métodos*

429. *Resultados*

430. *Discussão*

431. *Conclusão*

432. *Referências*

433. *Resumo*

434. *Abstract*

435. *Introdução*

436. *Objetivos*

437. *Métodos*

438. *Resultados*

439. *Discussão*

440. *Conclusão*

441. *Referências*

442. *Resumo*

443. *Abstract*

444. *Introdução*

445. *Objetivos*

446. *Métodos*

447. *Resultados*

448. *Discussão*

449. *Conclusão*

450. *Referências*

451. *Resumo*

452. *Abstract*

453. *Introdução*

454. *Objetivos*

455. *Métodos*

456. *Resultados*

457. *Discussão*

458. *Conclusão*

459. *Referências*

460. *Resumo*

461. *Abstract*

462. *Introdução*

463. *Objetivos*

464. *Métodos*

465. *Resultados*

466. *Discussão*

467. *Conclusão*

468. *Referências*

469. *Resumo*

470. *Abstract*

471. *Introdução*

472. *Objetivos*

473. *Métodos*

474. *Resultados*

475. *Discussão*

476. *Conclusão*

477. *Referências*

478. *Resumo*

479. *Abstract*

480. *Introdução*

481. *Objetivos*

482. *Métodos*

483. *Resultados*

484. *Discussão*

485. *Conclusão*

486. *Referências*

487. *Resumo*

488. *Abstract*

489. *Introdução*

490. *Objetivos*

491. *Métodos*

492. *Resultados*

493. *Discussão*

494. *Conclusão*

495. *Referências*

496. *Resumo*

497. *Abstract*

498. *Introdução*

499. *Objetivos*

500. *Métodos*

501. *Resultados*

502. *Discussão*

503. *Conclusão*

504. *Referências*

505. *Resumo*

506. *Abstract*

507. *Introdução*

508. *Objetivos*

509. *Métodos*

510. *Resultados*

511. *Discussão*

512. *Conclusão*

513. *Referências*

514. *Resumo*

515. *Abstract*

516. *Introdução*

517. *Objetivos*

518. *Métodos*

519. *Resultados*

520. *Discussão*

521. *Conclusão*

522. *Referências*

523. *Resumo*

524. *Abstract*

525. *Introdução*

526. *Objetivos*

527. *Métodos*

528. *Resultados*

529. *Discussão*

530. *Conclusão*

531. *Referências*

532. *Resumo*

533. *Abstract*

534. *Introdução*

535. *Objetivos*

536. *Métodos*

537. *Resultados*

538. *Discussão*

539. *Conclusão*

540. *Referências*

541. *Resumo*

542. *Abstract*

543. *Introdução*

544. *Objetivos*

545. *Métodos*

546. *Resultados*

547. *Discussão*

548. *Conclusão*

549. *Referências*

550. *Resumo*

551. *Abstract*

552. *Introdução*

553. *Objetivos*

554. *Métodos*

555. *Resultados*

556. *Discussão*

557. *Conclusão*

558. *Referências*

559. *Resumo*

560. *Abstract*

561. *Introdução*

562. *Objetivos*

563. *Métodos*

564. *Resultados*

565. *Discussão*

566. *Conclusão*

567. *Referências*

568. *Resumo*

569. *Abstract*

570. *Introdução*

571. *Objetivos*

572. *Métodos*

573. *Resultados*

574. *Discussão*

575. *Conclusão*

576. *Referências*

577. *Resumo*

578. *Abstract*

579. *Introdução*

580. *Objetivos*

581. *Métodos*

582. *Resultados*

583. *Discussão*

584. *Conclusão*

585. *Referências*

586. *Resumo*

587. *Abstract*

588. *Introdução*

589. *Objetivos*

590. *Métodos*

591. *Resultados*

592. *Discussão*

593. *Conclusão*

594. *Referências*

595. *Resumo*

596. *Abstract*

597. *Introdução*

598. *Objetivos*

599. *Métodos*

600. *Resultados*

601. *Discussão*

602. *Conclusão*

603. *Referências*

604. *Resumo*

605. *Abstract*

606. *Introdução*

607. *Objetivos*

608. *Métodos*

609. *Resultados*

610. *Discussão*

611. *Conclusão*

612. *Referências*

613. *Resumo*

614. *Abstract*

615. *Introdução*

616. *Objetivos*

617. *Métodos*

618. *Resultados*

619. *Discussão*

620. *Conclusão*

621. *Referências*

622. *Resumo*

623. *Abstract*

624. *Introdução*

625. *Objetivos*

626. *Métodos*

627. *Resultados*

628. *Discussão*

629. *Conclusão*

630. *Referências*

631. *Resumo*

632. *Abstract*

633. *Introdução*

634. *Objetivos*

635. *Métodos*

636. *Resultados*

637. *Discussão*

638. *Conclusão*

639. *Referências*

640. *Resumo*

641. *Abstract*

642. *Introdução*

643. *Objetivos*

644. *Métodos*

645. *Resultados*

646. *Discussão*

647. *Conclusão*

648. *Referências*

649. *Resumo*

650. *Abstract*

651. *Introdução*

652. *Objetivos*

653. *Métodos*

654. *Resultados*

655. *Discussão*

656. *Conclusão*

657. *Referências*

658. *Resumo*

659. *Abstract*

660. *Introdução*

661. *Objetivos*

662. *Métodos*

663. *Resultados*

664. *Discussão*

665. *Conclusão*

666. *Referências*

667. *Resumo*

668. *Abstract*

669. *Introdução*

670. *Objetivos*

671. *Métodos*

672. *Resultados*

673. *Discussão*

674. *Conclusão*

675. *Referências*

676. *Resumo*

677. *Abstract*

678. *Introdução*

679. *Objetivos*

680. *Métodos*

681. *Resultados*

682. *Discussão*

683. *Conclusão*

684. *Referências*

685. *Resumo*

686. *Abstract*

687. *Introdução*

688. *Objetivos*

689. *Métodos*

690. *Resultados*

691. *Discussão*

692. *Conclusão*

693. *Referências*

694. *Resumo*

695. *Abstract*

696. *Introdução*

697. *Objetivos*

698. *Métodos*

699. *Resultados*

700. *Discussão*

701. *Conclusão*

702. *Referências*

703. *Resumo*

704. *Abstract*

705. *Introdução*

706. *Objetivos*

707. *Métodos*

708. *Resultados*

709. *Discussão*

710. *Conclusão*

711. *Referências*

712. *Resumo*

713. *Abstract*

714. *Introdução*

715. *Objetivos*

716. *Métodos*

717. *Resultados*

718. *Discussão*

719. *Conclusão*

720. *Referências*

721. *Resumo*

722. *Abstract*

723. *Introdução*

724. *Objetivos*

725. *Métodos*

726. *Resultados*

727. *Discussão*

728. *Conclusão*

729. *Referências*

730. *Resumo*

731. *Abstract*

732. *Introdução*

733. *Objetivos*

734. *Métodos*

735. *Resultados*

736. *Discussão*

737. *Conclusão*

738. *Referências*

739. *Resumo*

740. *Abstract*

741. *Introdução*

742. *Objetivos*

743. *Métodos*

744. *Resultados*

745. *Discussão*

746. *Conclusão*

747. *Referências*

748. *Resumo*

749. *Abstract*

750. *Introdução*

751. *Objetivos*

752. *Métodos*

753. *Resultados*

754. *Discussão*

755. *Conclusão*

756. *Referências*

757. *Resumo*

758. *Abstract*

759. *Introdução*

760. *Objetivos*

761. *Métodos*

762. *Resultados*

763. *Discussão*

764. *Conclusão*

765. *Referências*

766. *Resumo*

767. *Abstract*

768. *Introdução*

769.

Os venenos de insetos da Classe Hymenoptera contêm enzimas, peptídeos, aminas e aminoácidos excitatórios. Neste trabalho, investigamos as atividades enzimáticas e biológicas de um extrato aquoso do saco de veneno (ESV) da vespa social *Polistes lanio lanio*. O ESV de *P. l. lanio* possui baixa atividade fosfodiesterásica, elastásica, fosfatásica (ácida e alcalina) e L-amino-ácido oxidase; moderados níveis de hialuronidase e protease e um alto nível de fosfolipase. A eletroforese (SDS-PAGE) revelou a presença de mais de 10 componentes com pesos moleculares variando de 14.000-100.000. A cromatografia de ESV em Sephacryl S200 HR resultou em sete picos, o primeiro destes contém atividades hemolítica e fosfolipásica. O ESV exibiu uma potente atividade hemolítica direta em eritrócitos humanos, sendo dose (12,5-200 µg/ml) e tempo (até 5 h) dependente (n=3). Eritrócitos humanos e de cão não foram aglutinados pelo ESV (2,5 mg/ml; n=3). Comparado ao ADP (3 µM), ESV (50-400 µg/ml) produziu uma agregação dose-dependente fraca em plasma humano rico em plaquetas (n=3). Por outro lado, ESV (400 µg/ml) não agregou plaquetas humanas lavadas, porém desencadeou agregação por doses não agregantes de trombina (n=3). Em íleo isolado de rato, o ESV produziu contrações dose-dependente (4-16 µg/ml), as quais não foram afetadas pelo pré-tratamento do tecido com atropina (antagonista de receptor muscarínico, 0,6 µg/ml) ou ciproheptadina (antagonista de histamina e serotonina, 0,2 µg/ml), mas foram completamente abolidas pelo HOE-140 (1 µg/ml, n=3), antagonista do receptor B₂ da bradicinina, sugerindo a presença de cininas no ESV. Estes resultados indicam que as atividades enzimáticas e biológicas do ESV de *P. l. lanio* são similares às de outras vespas sociais.

1. INTRODUÇÃO

A classe Inseta do filo Artropoda (do grego *arthros* ou articulação + *podos* ou pé) perfaz mais de um milhão de espécies. São os mais abundantes e espalhados de todos os animais terrestres, sendo os mais importantes invertebrados que podem viver em ambientes secos e os únicos capazes de voar (STORER, 1991). A ordem Hymenoptera possui interesse clínico significativo, uma vez que muitos envenenamentos de importância médica são causados por membros pertencentes às famílias Apidae (abelhas), Formicidae (formigas), e Vespidae (vespas) (SCHMIDT, BLUM, OVERAL, 1980; DESHAZO, BUTCHER, BANKS, 1990).

1.1. FAMÍLIA APIDAE

A família Apidae é dividida em três subfamílias: Apinae (abelhas), Bombinae (mamangavas) e Meliponinae. Esta última subfamília é constituída por espécies sem ferrão e é o grupo mais diverso com cinco (possivelmente seis) gêneros (MICHENER, 1986; ROUBIK, 1989). A subfamília Bombinae possui dois gêneros, *Bombus* e *Psithyrus*, sendo o último destes constituído inteiramente por abelhas parasitas sociais. Existem, aproximadamente, 400 espécies do *Bombus* (HEINRICH, 1979). Embora as diversas espécies de abelhas tenham comportamento e vidas sociais diferentes, todas são adaptadas para coletar e se alimentar de pólen e néctar. O pólen fornece proteínas, enquanto o néctar contém um grande número de açúcares (AKRE & REED, 1984). O veneno de abelhas é uma mistura complexa de enzimas, peptídeos, e substâncias de baixo peso molecular, muitas das quais exibindo uma potente atividade fisiológica (HABERMANN, 1972).

A fosfolipase A_2 (PLA₂) e a hialuronidase são as principais enzimas encontradas no veneno de *A. mellifera*. A PLA₂ presente no veneno da *Apis mellifera* é classificada como uma fosfatidil acil hidrolase (EC 3.1.1.4). Possui peso molecular de 36.800 e um ponto isoeletrico em torno de pH 8.6 (MUNJAL & ELLIOT, 1972). A hialuronidase (fator de difusão) acelera a propagação do veneno através dos tecidos pela degradação de polímeros do ácido hialurônico presentes no cimento intercelular (HABERMANN, 1972). Esta enzima também é um dos principais componentes antigênicos presentes no veneno de abelha.

O veneno de abelhas é muito rico em peptídeos básicos com peso molecular entre 2.000 e 6.000 (O'CONNOR & PECK, 1978). A melitina constitui a maior fração

peptídica (aproximadamente 50% do peso seco do veneno) exibindo pronunciada propriedade surfactante e potente atividade hemolítica. Este peptídeo tem ação sinérgica com a PLA₂ (HABERMAN, 1972). A apamina é uma potente neurotoxina, com ação no sistema nervoso central e periférico, comprometendo a transmissão de determinados impulsos inibitórios. O peptídeo degranulador de mastócitos (MCDP) é o principal responsável pela liberação de mediadores de mastócitos e basófilos, tais como a histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico e fatores que atuam sobre plaquetas e eosinófilos (HABERMANN, 1972).

Além destas substâncias o veneno de abelha também contém componentes de baixo peso molecular (menor que 1000), tais como: histamina, serotonina, dopamina, e noradrenalina (O'CONNOR & PECK, 1978).

1.2. FAMÍLIA FORMICIDAE

As estimativas para o número de espécies descritas na família Formicidae variam entre 12.000 a 14.000 (WILSON, 1971). Esta família é composta por 11 subfamílias, sendo que quatro, dentre elas, têm uma distribuição muito limitada (AKRE & REED, 1984) (Tabela 1). As espécies que apresentam ferrão são membros pertencentes às subfamílias mais primitivas como Myrmecinae.

Em subfamílias mais avançadas como Dolichoderinae e Formicinae, o ferrão é vestigial ou ausente (AKRE & REED, 1984). A subfamília Nothomyrmecinae, que possui uma única espécie, *Nothomyrmecia macrops*, é a mais primitiva das subfamílias (BLUM, 1984).

O veneno de formigas contém muitas enzimas como fosfolipase A, hialuronidase, lipase, esterase, protease, fosfatases (ácida e básica) e fosfodiesterase, porém estas enzimas variam quali e quantitativamente entre espécies e gêneros. Assim, o veneno de *Paraponera clavata* possui grande quantidade de enzimas como hialuronidase, lipase e fosfolipase, enquanto que o veneno de *Pseudomyrmex mexicanus* tem baixa atividade fosfolipásica e traços de hialuronidase e fosfatase ácida e não há presença de lipases ou protease (BLUM, 1984).

TABELA 1. FAMÍLIA FORMICIDAE: SUBFAMÍLIAS E DISTRIBUIÇÃO.

Subfamília	Distribuição
Ponerinae	Tropical
Myrmecinae	Principalmente Austrália
Pseudomyrmecinae	Ásia tropical, África, América
Myrmicinae	Distribuição global
Dorylinae	Principalmente tropical
Ecitoninae	Ásia, África e América
Dolichoderinae	Distribuição global
Formicinae	Distribuição global

Fonte: AKRE & REED (1984).

Também estão presentes no veneno substâncias de baixo peso molecular como histamina, cininas e neurotoxinas que atuam como agonistas em músculo liso e no bloqueio neurossimpático em insetos. Uma das neurotoxinas mais ativas, a poneratoxina, ocorre no veneno da *P. clavata* (PIEK, 1991). Uma potente atividade hemolítica também já foi observada em muitas espécies de formigas como *Solenopsis* sp., *Myrmecia* sp. e *Pseudomyrmex* sp. (BLUM, 1984, 1992).

O veneno de formigas difere em parte do veneno de abelhas e vespas por possuir em sua composição alcalóides, como as piperidinas, presentes na maioria das espécies e os tetraponerinos, presentes no veneno de formigas do gênero *Tetraponera* (BLUM, 1992).

Espécies da subfamília Formicinae (lava-pés) apresentam 60% de ácido fórmico em seu veneno que também contém aminoácidos livres e pequenos peptídeos. O ácido fórmico é altamente corrosivo e citotóxico sendo capaz de causar necrose quando aplicado sobre a pele (DESHAZO *et al.*, 1990).

1.3. FAMÍLIA VESPIDAE

1.3.1. Taxonomia e distribuição geográfica

As vespas estão distribuídas em três grandes subfamílias: Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae (RICHARDS, 1978). As subfamílias Vespinae e Polistinae contêm a maioria dos vespídeos sociais enquanto que a subfamília Stenogastrinae possui cerca de 40 a 60 espécies dos gêneros *Stenogaster* e *Parishnogaster*, distribuídas pelo sudoeste Asiático (AKRE & REED, 1984; EDERY, ISHAY, GITTER, JOSHUA, 1978).

A subfamília Polistinae compreende três tribos: *Ropalidiini*, *Polybiini* e *Polistini*. A tribo *Ropalidiini*, com o gênero *Ropalidia*, possui aproximadamente 100 espécies distribuídas entre Austrália, sudoeste asiático, Índia e África. A tribo *Polybiini* possui 450 espécies em 26 gêneros espalhados pela América do Sul e Central com algumas poucas espécies encontradas na Ásia e sudoeste africano. A tribo *Polistini* é representada por apenas dois gêneros, *Polistes* e *Sulcopolistes*, com distribuição global.

A subfamília Vespinae inclui quatro gêneros: *Provespa* (com apenas três espécies), *Vespa* (aproximadamente 20 espécies), *Dolichovespula* (aproximadamente 18 espécies) e *Vespula* (com 20 a 24 espécies). Esta subfamília está distribuída por toda América do Norte, o sudoeste asiático, Europa, Índia e parte da África.

1.3.2. Aparato venenífero

O aparelho de ferroar das vespas é considerado um ovopositor modificado, portanto somente operárias e rainhas são capazes de ferroar. O aparato (Figura 1) é formado por dois filamentos que constituem a glândula ácida (formada por células secretoras). Estes desembocam em um reservatório (saco de veneno) constituído por uma grossa parede de fibras e musculatura e onde o veneno é estocado até o momento da picada. Uma glândula acessória (glândula de Dufour) ligada ao canal condutor do veneno e um ferrão completam o aparelho (KANWAR & SETHI, 1971; KANWAR & KANWAR, 1975; Bar-Nea, ROSENBERG, ISHAY, 1976).

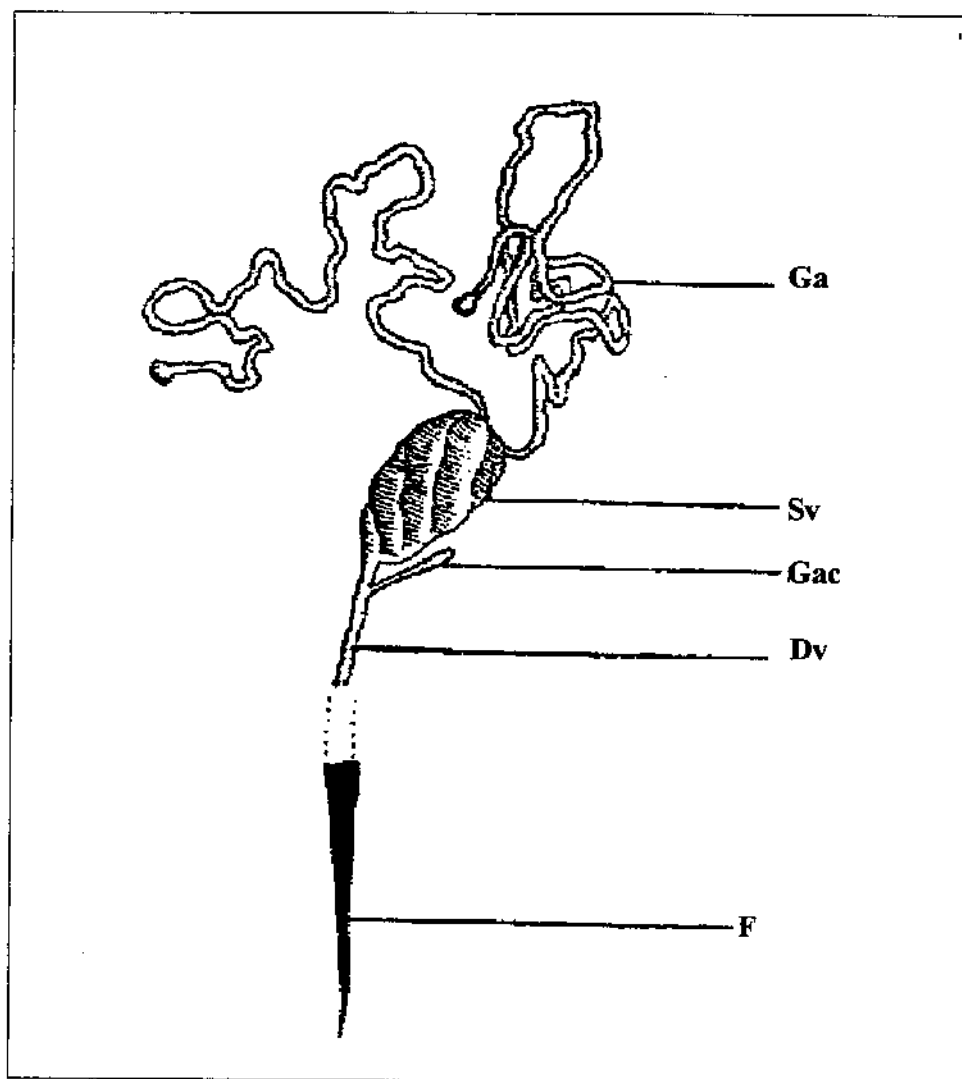


Figura 1. Representação esquemática do aparato venenífero de vespídeos.
F- ferrão, Dv- ducto de veneno, Ga- glândula ácida, Gac- glândula acessório,
Sv- saco de veneno. (Segundo Kanwar & Shethi, 1971)

1.3.3. Composição bioquímica do veneno de vespas

Substâncias de baixo peso molecular

Aminas biogênicas são componentes comuns em venenos de vespas. A histamina é muito comum, sendo encontrada em vespas sociais dos gêneros *Polistes*, *Vespa*, *Paravespula*, *Vespula* e em vespas solitárias dos gêneros *Eumenes*, *Abispa* e *Rhynchium* (NAKAJIMA, 1984). Outras aminas como dopamina, adrenalina e noradrenalina foram identificadas no veneno de *Dolichovespula arenaria*, *D. maculata* (OWEN, 1971), *Vespa orientalis* (EDERY, ISHAY, GITTER, 1972), *Paravespula germanica*, *Polistes vulgaris* e *Vespa crabo* (OWEN & BRIDGES, 1982; ISHAY, ABRAHAM, GRUNFELD, GITTER, 1974). Serotonina também ocorre em grande quantidade em vespas dos gêneros *Vespa*, *Vespula*, *Dolichovespula*, *Paravespula*, *Polistes*, *Polybia* e *Synoica* (EDERY *et al.*, 1972; NAKAJIMA, 1984). A acetilcolina tem sido encontrada apenas nos venenos de *Vespa crabo* e *Vespa orientalis*, estando ausente em vespas dos gêneros *Polistes*, *Vespula* e *Dolichovespula* (EDERY *et al.*, 1978).

PEPTÍDEOS

Cininas

Foram JAKES & SCHACHTER (1954) os primeiros a investigar a distribuição das cininas (bradicinina e seus homólogos) em venenos de vespas, e observaram a presença de um composto no veneno de *Paravespula vulgaris* capaz de contrair músculo liso, completamente diferente de outros espasmogênicos. Mais tarde, SCHACHTER & THAIN (1954) determinaram a natureza peptídica deste material que era inativado pela tripsina e quimotripsina bem como após aquecimento em meio ácido ou básico. Devido à elevada homologia na sequência de aminoácidos e atividade farmacológica semelhante à bradicinina, estes peptídeos são conhecidos como vespacininas (do gênero *Vespa*) ou polisticininas (do gênero *Polistes*) (SCHMIDT, 1982; NAKAJIMA, 1986). A Tabela 2 mostra a sequência de aminoácidos e a variação entre as cininas nos venenos de vespas.

PRADO, TAMURA, FURANO, PISANO, UDENFRIEND (1966) foram os primeiros a caracterizar quimicamente as cininas em venenos de vespas. A partir de um pool de venenos (*Polistes exclamans*, *P. annularis* e *P. fuscatus*), as cininas foram purificadas e sua atividade avaliada em preparação isolada de útero de rata. Estes autores observaram que o peptídeo obtido (denominado 'cinina 3') possuía a mesma sequência de aminoácidos na região do C-terminal que a bradicinina, mas em uma potência muito maior. Em nível molar (sendo a bradicinina igual a 1), a potência da cinina seria 2, em útero de rata, 5, na capacidade de aumentar a permeabilidade vascular em cobaia e 10, na produção de dor no homem (HABERMANN, 1972; EDERY *et al.*, 1978).

Do ponto de vista farmacológico, as cininas são caracterizadas por suas ações hipotensiva, algogênica e capacidade de causar contração em músculo liso de diferentes tecidos (SCHMIDT, 1982). Estes peptídeos são também um grupo interessante de inseticidas naturais, além disso vespas sociais usam seu veneno como repelente para intrusos (vespas ou outros insetos) (PIEK, 1991).

MASTOPARANOS

Os mastoparanos constituem um grupo de tetradecapeptídeos ricos em aminoácidos hidrofóbicos, tais como alanina, lisina e leucina (Tabela 3). Estes peptídeos apresentam atividade liberadora de histamina a partir da degranulação de mastócitos (NAKAJIMA, YASUHARA, UZU, WAKAMATSU, FUKUDA, TSUKAMOTO, 1985). Hirai, YASUHARA, YOSHIDA, NAKAJIMA, FUJINO, KITADA (1979) foram os primeiros a isolar e caracterizar um mastoparano usando o veneno de *Paravespula lewisii*, que em doses de 0,5 µg/ml já causava a degranulação de mastócitos e em doses de 10-100 µg causava lise de eritrócitos.

Além da liberação de histamina de mastócitos, os mastoparanos atuam sobre as mais diversas células causando secreção de mediadores através da ativação dos receptores de proteína-G (PERIANIN & SNYDERMAN, 1989). Nas células pituitárias, induzem a exocitose de hormônios como a prolactina (Mau, WITT, VILHARDT, 1994) e nas

células β do pâncreas, estimulam a exocitose de insulina e elevam o nível de Ca^{2+} citosólico (KOMATSU, MCDERMOTT, GILLISON, SHARP 1993; JONES, MANN, PERSAUD, WHEELER-JONES, 1993). Em plaquetas, os mastoparanos causam a liberação de serotonina e aumento de AMP cíclico. Esta exocitose não envolve elevação intracelular de Ca^{2+} ou mobilização de ácido araquidônico (OZAKI, MATSUMOTO, YATOMI, HIGASHIHARA, KARIYA, KUME, 1990; WHEELER-JONES, SAERMARK, KAKKAR, AUTHI, 1992). Apenas o mastoparano B (MP-B) isolado no veneno de *Vespa basalis* (HO & HWANG, 1991) tem atividade *in vivo* (HO, HWANG, LIN, CHEN, YU, WANG, 1994, 1996) provocando edema local, depressão cardiovascular e uma potente atividade hemolítica que atua sinergicamente com a proteína letal (hornetina) presente neste veneno (HO & KO, 1986; HO & HWANG, 1991).

NEUROTOXINAS

As neurotoxinas dos venenos de vespas são peptídeos que atuam nos gânglios do sistema nervoso de artrópodos, causando paralisia (mecanismo usado por vespas solitárias para caçar a presa) devido à depleção irreversível de neurotransmissores pré-sinápticos (PIEK, 1991). Algumas neurotoxinas já foram isoladas, como é o caso da mandaratoxina, uma proteína básica, no veneno de *Vespa mandarina*, que atua reduzindo a corrente de sódio no axônio, levando à diminuição do potencial de ação (KAWAI, ABE, NIWA, 1981). É encontrada no veneno de *Philanthus triangulum* outra toxina, a filantotoxina (PhTX), que causa bloqueio dos receptores glutâmicos levando à paralisia muscular (ELDEFRAWI, ANIS, ELDEFRAWI, 1993).

TABELA 2. CININAS DE VENENOS DE VESPAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bradicinina	Arg-	Pro-	Pro-	Gly-	Phe-	Ser-	Pro-	Phe-	Arg
<i>Vespa mandarinia</i>	Lys-Met	- Arg-	Pro-	Pro-	Gly-	Phe-	Ser-	Pro-	Phe- Arg
<i>Vespa xanthoptera</i>	Gly-	Arg-	Pro-	Hyp-	Gly-	Phe-	Ser-	Pro-	Phe- Arg- Ile- Asp
<i>Polistes rothneyi</i>	Arg-	Pro-	Pro-	Gly-	Phe-	Thr-	Pro-	Phe-	Arg
<i>Polistes fuscatus</i>	Glu- Thr- Asn-	Lys- Lys- Lys-Leu-	Arg-	Pro-	Pro-	Gly-	Phe-	Ser-	Pro- Phe- Arg
<i>Polistes exclamans</i>	Glu- Thr- Asn-	Lys- Lys- Lys-Leu-	Arg-	Pro-	Pro-	Gly-	Phe-	Ser-	Pro- Phe- Arg
<i>Polistes annularis</i>	<i>Glu- Thr- Asn- Lys- Lys- Lys-Leu- Arg- Pro- Pro- Gly- Phe- Ser- Pro- Phe- Arg</i>								
<i>Paravespula maculifrons</i>	Thr- Ala- Thr- Thr- Arg- Arg- Arg-	Gly-Arg-	Pro-	Pro-	Gly-	Phe-	Ser-	Pro-	Phe- Arg

Fonte: PIEK (1991). Os aminoácidos em negrito diferem da bradicinina

TABELA 3. ESTRUTURA DE MASTOPARANOS

<i>Polistes jadwigae</i>	Val- Asp- Trp- Lys- Lys- Ile- Gly- Gln- His- Ile- Leu- Ser- Val- Leu
<i>Vespa analis</i>	Ile- Lys- Trp- Lys- Ala- Ile- Leu- Asp- Ala- Val- Lys- Lys- Val- Ile
<i>Vespa mandarinia</i>	Ile- Asn- Leu- Lys- Ala- Ile- Ala- Ala- Leu- Ala- Lys- Lys- Leu- Leu
<i>Vespa xanthoptera</i>	Ile- Asn- Trp- Lys- Gly- Ile- Ala- Ala- Met- Ala- Lys- Lys- Leu- Leu
<i>Vespula lewisii</i>	Ile- Asp- Leu- Lys- Ala- Leu- Ala- Ala- Leu- Ala- Lys- Lys- Ile- Leu

Fonte: NAKAJIMA (1986).

ENZIMAS

Fosfolipases

A maioria dos componentes de alto peso molecular presente no veneno de vespas são proteínas, com atividade enzimática. O veneno de vespas sociais é rico em fosfolipases (enzimas que hidrolisam fosfolipídeos em sítios específicos). A fosfolipase A₂ (fosfatidil acil hidrolase, EC 3.1.1.4, PLA₂) desacila na posição-2 o glicerol na molécula de fosfolipídeos, a fosfolipase B (lisofosfolipase lisoleucina acil hidrolase, EC 3.1.1.5, PLB) remove um ácido graxo de lisofosfolipídeos produzidos pela ação da PLA₂ e a fosfolipase C (fosfatidilcolina colinofosfohidrolase, EC 3.1.4.3, PLC) retira a base fosforilada de fosfolipídeos, deixando um diglicerídeo (HABERMANN, 1972; ROSENBERG, ISHAY, GITTER, 1977). Na maioria das espécies de vespas, a PLA₂ é a fosfolipase predominante, embora alguns venenos, como o da *Vespa orientalis*, contenham quantidades iguais de PLA e PLB (ROSENBERG *et al.*, 1977).

KING, KCHOUMIAN, JOSLYN (1984) demonstraram que os venenos de *Polistes annulares*, *Polistes exclamans*, *Vespa xanthoptera* e *Vespula germanica* contêm uma mistura de PLA₁ (desacila na posição-1 o glicerol) e PLB, enquanto que o veneno de *Vespa orientalis* é uma mistura de PLA₂ com PLB. No veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes* estão presentes fosfolipases A₂, B e C; neste caso a PLA₂ representa 3,7% do conteúdo protéico do veneno (COSTA, 1997).

A PLA₂ é bastante estável em meio ácido, mas é destruída com aquecimento em meio alcalino (CONDREA & DE VRIES, 1965). O veneno de *Vespa orientalis* perde aproximadamente 80% de sua atividade de PLA₂ quando aquecido por 3 minutos em pH 5.5, já a atividade da PLB é abolida após 15 min de aquecimento em pH 9,4 (FLETCHER, 1979).

A atividade fosfolipásica varia muito de gênero para gênero. Vespas sociais geralmente possuem alta atividade, porém existem exceções como *Dolichovespula maculata* e *Apoica pallens* onde a atividade fosfolipásica é muito baixa (SCHMIDT, BLUM, OVERAL, 1986; OLIVEIRA & PALMA, 1998).

A PLA₂ é capaz de produzir uma série de efeitos farmacológicos tais como: contração de músculo liso, queda da pressão arterial, hemólise *in vivo* e *in vitro*, liberação de histamina e heparina de mastócitos. Esta enzima também é antigênica, sendo um dos principais alérgenos presentes no veneno tanto de vespas como de abelhas (PIEK, 1984; EDERY *et al.*, 1978).

HIALURONIDASE

JAQUES (1956) foi o primeiro a demonstrar a presença de hialuronidase no veneno da vespa *Paravespula vulgaris*. Tanto o veneno como o extrato de sacos de veneno de *Vespa orientalis* são capazes de hidrolizar ácido hialurônico (EDERY *et al.*, 1972). O pH ótimo desta enzima está em torno de 4,5-5,0. Sozinha, a hialuronidase não possui grande toxidez e não provoca ação localizada ou sistêmica, mas é considerada o 'fator de difusão', facilitando a difusão de outros constituintes tóxicos (HABERMANN, 1972).

OUTRAS ENZIMAS

Também estão presentes no veneno de vespas fosfatases ácida e alcalina, fosfodiesterases, proteases e nucleases, porém sem ação tóxica. (SLOR, RING, ISHAY, 1976; EDERY *et al.*, 1978; SCHMIDT *et al.*, 1986).

1.3.4. Farmacologia dos venenos de vespas

A administração de venenos de vespas produz muitos efeitos farmacológicos em preparações *in vivo* e *in vitro* (EDERY *et al.*, 1972; GELLER *et al.*, 1976; HO, HWANG, CHEN, 1993, HO *et al.*, 1994; HORI *et al.*, 1977; JOSHUA *et al.*, 1971; NEUMAN *et al.*, 1991). A tabela 4 resume as principais ações farmacológicas observadas nos venenos de diferentes gêneros e espécies de vespas.

Sistema cardiovascular

O veneno de vespa causa queda imediata da pressão, quando injetado pela via intravenosa, em todas as espécies de animais testadas. Esta ação é devida à presença de histamina, acetilcolina e, principalmente, cininas. A gravidade e duração deste efeito varia entre as diferentes espécies de animais (EDERY *et al.*, 1978; RUBIN, DUVDEVANI, ISHAY, 1993; GELLER *et al.*, 1976).

A administração de grande quantidade de veneno de *Vespa orientalis* em cães leva a uma queda drástica da pressão arterial, a respiração é acelerada, ocorre bradicardia, aumento do débito cardíaco e queda da temperatura corporal do animal, os efeitos cardíacos observados resultam de uma estimulação vagal e β -adrenérgica causado por um peptídeo presente neste veneno (KAPLINSKY, ISAHY, GITTER, 1974; RUBIN *et al.*, 1993). HO *et al.* (1994), estudando as atividades do mastoparano B, observaram que este peptídeo causa queda da pressão arterial em ratos além de liberar serotonina de plaquetas e outros autacóides de mastócitos. Esta atividade do mastoparano sobre o sistema cardiovascular poderia explicar as atividades inotrópicas negativas observadas por KAPLINSKY *et al.* (1974).

TABELA 4. EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE VENENOS DE VESPAS

Veneno	Efeito	Espécie
A. Sistema cardiovascular		
<i>Vespa vulgaris</i> , <i>V. orientalis</i> , <i>Vespula maculata</i> e <i>V. maculifrons</i>	Hipotensão	Ratos, coelhos, gatos, cães
<i>Polistes sp</i> , <i>Vespa crabo</i> e <i>V.orientalis</i>	Hemólise	Homem, gato, coelho, rato, camundongo, porco
<i>Vespa orientalis</i>	Anticoagulação	Homem, cão
<i>Vespa orientalis</i>	Hiperglicemia	Gato
<i>Vespa orientalis</i>	Aumento da permeabilidade da microcirculação	Rato, coelho, camundongo
B. Sistema respiratório		
<i>Vespa orientalis</i>	Broncoconstrição	Cobaia
<i>Vespa orientalis</i>	Taquipnéia	Cão, gato
C. Músculo estriado		
<i>Paravespula germanica</i>	Paralisia	Gato, camundongo, rato
D. Preparações isoladas		
<i>Paravespula germanica</i>	Útero (contração)	Rata
<i>Polistes gallicus</i>	Intestino (contração)	Coelho, cobaia
<i>Paravespula germanica</i> , <i>Vespa crabo</i> , <i>Vespula vulgaris</i> ,	Contração de músculo liso (íleo)	Cobaia
<i>Vespa crabo</i>	Intestino (contração)	Camundongo
<i>Vespa crabo</i> , <i>Vespa orientalis</i>	Contração de músculo abdominal	Sapo
<i>Polistes sp</i>	Corção (inotropismo negativo e positivo).	Sapo
<i>Paravespula germanica</i> , <i>Vespa orientalis</i> , <i>Vespula maculifrons</i> , <i>V. vulgaris</i> e <i>V. squamosa</i> ,	Liberação de histamina	Rato (mastócitos), humano (células brancas)
E. Sistema nervoso central		
<i>Vespa orientalis</i>	Interferência na atividade elétrica cerebral	Gato

HEMÓLISE

A ação hemolítica é causada por mecanismos de ação direta e indireta (JOSHUA & ISHAY, 1977). A atividade lítica direta é atribuída à proteínas básicas, como a melitina no veneno de abelhas (HABERMANN, 1972). A atividade lítica indireta está associada à PLA₂, que hidrolisa fosfolipídeos séricos liberando lisofosfolipídeos, os quais, por sua vez, lisam eritrócitos intactos (SCHMIDT, 1982). Como consequência destas duas ações, o efeito hemolítico causado pelo veneno de vespas é acentuado.

Trabalhos realizados com diferentes espécies de animais demonstraram uma variação na sensibilidade de eritrócitos à hemólise por venenos de vespas. Assim eritrócitos humanos, de cobaia, gato, coelho, rato e camundongo são suscetíveis ao veneno enquanto que os eritrócitos de carneiro, cavalo, boi e camelo mostraram-se resistentes à hemólise (JOSHUA *et al.*, 1971; JOSHUA & ISHAY, 1973).

Vários fatores podem alterar a atividade hemolítica: temperaturas baixas (< 20°C) inibem a hemólise, assim como meios de incubação com pH ácido (o pH ótimo varia entre 7,0-7,4). A diálise prolongada do veneno total não inibe a atividade lítica direta, porém aquecendo-se o veneno durante 2-10 minutos em pH ácido, leva à abolição da ação lítica direta enquanto que uma parte da atividade lítica indireta ainda é preservada (JOSHUA & ISHAY, 1973; 1977; EDERY *et al.*, 1978).

Atividade anticoagulante

O veneno de abelhas (*Apis mellifera*) e de vespas possuem atividade anticoagulante. Trabalhos realizados por JOSHUA & ISHAY (1973; 1975), EDERY *et al.* (1978) e KORNBERG *et al.* (1988) demonstraram que extratos do veneno de *Vespa orientalis* causavam prolongamento no tempo de recalcificação, porém este aumento não era devido à atividade fibrinogenolítica mas provavelmente resultou da inativação da tromboplastina tecidual bem como da inibição da tromboplastina endógena.

A atividade anticoagulante observada nos venenos de vespa pode ser mediada pelos grupos básicos presentes nas proteínas, responsáveis pela atividade anticoagulante. Estes grupos se ligariam aos grupos ácidos presentes na tromboplastina, inibindo sua atividade (HABERMANN, 1972; JOSHUA & ISHAY, 1975).

1.3.5. Antigenicidade e aspectos imunológicos

O veneno de vespídeos contém três componentes alergênicos: hialuronidase, fosfolipase e antígeno 5. Estas três proteínas possuem uma forte atividade na liberação de histamina em ensaios usando-se leucócitos humanos sensibilizados (CASCONE *et al.*, 1995). O antígeno 5 não é encontrado em venenos de abelhas e sua função bioquímica ainda é desconhecida. A fosfolipase é o componente alergênico presente em maior quantidade (KING *et al.*, 1984).

Vários trabalhos têm investigado as reações cruzadas entre anti-soros contra venenos de vespas. KING *et al.* (1978) observaram a existência de uma reação cruzada entre venenos de *Vespula maculata* e *Vespula maculifrons*. A reação cruzada de maior intensidade ocorreu com a hialuronidase enquanto que a fosfolipase mostrou uma reação bem menos potente. HOFFMANN (1985 a, b) avaliou a reatividade cruzada entre *V. maculifrons*, *V. squamosa*, *Dolichovespula maculata* e *Polistes exclamans*, observando que tanto a hialuronidase quanto a fosfolipase e antígeno 5 exibiram reatividade cruzada com imunoglobulina IgE humana. O veneno de *Polistes* apresentou hialuronidase e antígeno 5 diferentes daqueles encontrados em antígenos de *Vespula* e *Dolichovespula*. REISMAN *et al.* (1982), estudando o anti-soro contra várias espécies de *Polistes* e comparando-os com outras espécies e gêneros, encontrou resultados semelhantes, observando que o veneno de *Polistes* obtido por estimulação elétrica mostrou ser mais potente que o extrato de sacos de veneno. Este extrato também contém algumas proteínas do corpo do animal que não estavam presentes no veneno obtido por estimulação elétrica. O veneno de *Polistes* não apresentou reação cruzada com anti-soros de outros gêneros, porém reagiu muito pouco ou nada com venenos de vespas dos gêneros *Vespula* e *Dolichovespula*. Estes dados sugerem um limite de reação cruzada entre anti-soros de *Polistes* com outros gêneros de vespídeos.

1.3.6 Biologia de vespas do gênero *Polistes*

O gênero *Polistes* tem tido sua biologia melhor estudada em comparação com outras vespas sociais (AKRE, 1982). No entanto, apenas algumas espécies tropicais já foram investigadas em maiores detalhes, entre elas *Polistes versicolor* (RODRIGUES, 1968, 1982; GOBBI & ZUCHI, 1980, 1985), *Polistes erythrocephalus* (YOUNG, 1986) e *Polistes canadensis* (JEANNE, 1982).

De acordo com RICHARDS (1978), *Polistes (aphanilopterus) lanio* (FABRICIUS, 1775) foi primeiramente designada *Vespa lanio*, FABRICIUS (1775) e posteriormente, *Polistes lanio*, FABRICIUS (1804), *Aphanilopterus vagabundus*, MEUNIER (1888) e *Polistes canadensis* var. *lanio*, BEQUAERT (1940).

Em se tratando de um gênero cosmopolita, o ciclo biológico de *Polistes* pode apresentar muitas variações em diferentes latitudes (GIANNOTTI, 1992). Estudos realizados em colônias de *P. versicolor versicolor* durante três anos (GOBBI & ZUCCHI, 1980) verificaram uma variação temporal em relação ao ciclo colonial da espécie. Este estudo sugere que na falta de um inverno rigoroso, as espécies tropicais e subtropicais de *Polistes* tem seus ciclos de vida desregulados.

O ninho típico de vespas do gênero *Polistes* é constituído de um único favo descoberto, preso ao substrato por um pedúnculo (GIANNOTTI, 1992). Rodrigues (1968) denominou “associação de ninhos” o fenômeno da construção de dois até dezenas de favos, por uma mesma colônia de *P. l. lanio*.

O gênero *Polistes* é de especial interesse no estudo da evolução do comportamento social das vespas por diversos motivos: o fato de apresentar ninhos com favos visíveis, e colônias relativamente pequenas possibilita a observação de todos os indivíduos simultaneamente; por não possuir castas morfologicamente distintas dá a possibilidade de qualquer fêmea tornar-se uma rainha e por ter ampla distribuição geográfica permite a comparação das diferentes estratégias adaptativas aos diversos ambientes que ocupa. Tais fatores levaram *Polistes* a ser chamado de ‘gênero chave’ para o entendimento da evolução do comportamento social das vespas (EVANS & WEST-EBERHARD, 1970; GIANNOTTI, 1992).

1.3.7. Objetivos

Considerando os fatos acima citados, nós nos propusemos a caracterizar a composição e atividades enzimáticas e biológicas de um extrato aquoso de sacos de veneno da vespa social *P. l. lanio* (figura 2), uma espécie de vespa comum no sudeste do Brasil, cujo veneno ainda não foi estudado.



FIGURA 2. NINHO DE *POLISTES LANIO LANIO*

2. RESULTADOS

2.1. TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**ENZYMATIC AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A VENOM SAC
EXTRACT FROM THE SOCIAL WASP**

Polistes lanio lanio

Marta Pitali Buzin and Stephen Hyslop*

Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Campinas, SP, Brasil

Running title: Activities of *P. l. lanio* wasp venom

*Author for correspondence at: Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. **Tel.:** (55)-(19)-788-7185/8173. **Fax:** (55)-(19)-289-2968.

Hymenopteran venoms contain enzymes, peptides, amines and excitatory amino acids. We have examined the enzymatic and biological activities of an aqueous venom sac extract (VSE) from the Brazilian social wasp *Polistes lanio lanio*. The VSE had low phosphodiesterase, elastase, acid and alkaline phosphatase and L-amino acid oxidase activities, moderate levels of hyaluronidase and protease and high phospholipase activity. SDS-PAGE revealed the presence of several components with molecular weights of 14,000-100,000. Gel filtration of VSE resulted in seven peaks, the first of which contained the hemolytic and phospholipase activities. The VSE exhibited potent direct hemolytic activity on human erythrocytes which was dose- (12.5-200 µg/ml) and time- (up to 5 h) dependent. VSE (50-400 µg/ml) produced weak, dose-dependent aggregation of human platelet-rich plasma and did not aggregate washed human platelets (400 µg/ml), but potentiated the responses to non-aggregatory doses of thrombin. Dog and human erythrocytes were not agglutinated by VSE (2.5 mg/ml). In the rat isolated ileum, VSE (4-16 µg/ml) produced contractions which were not prevented by atropine (muscarinic receptor antagonist, 0.6 µg/ml), cyproheptadine (histamine and serotonin receptor antagonist, 0.2 µg/ml), but were abolished by the bradykinin B₂ receptor antagonist HOE-140 (1 µg/ml), suggesting the presence of kinins. These results indicate that the composition of *P. l. lanio* VSE is similar to that of other wasp species.

Key words: chromatography, electrophoresis, enzymes, hemagglutination, hemolysis, kinins, platelet aggregation, venom, wasp.

INTRODUCTION

Vespid (hornets, polistine wasps and yellow jackets) venoms are similar in composition, and consist of a mixture of enzymes (mainly hyaluronidase, phosphatases and phospholipases) [9, 32], peptides such as kinins and mastoparans [17, 28, 30, 35, 37], and low molecular weight substances, including acetylcholine, catecholamines, excitatory amino acids, histamine and serotonin [1, 8, 15, 24].

Most studies of wasp venoms have involved Asian, European and North American species [24, 29, 30]. Relatively little is known of the biochemical and pharmacological actions of South American, particularly Brazilian, species [3, 6, 27, 32, Costa H (1997) unpublished Masters thesis, Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil]. We report here some enzymatic and biological properties of a venom sac extract (VSE) from *Polistes lanio lanio*, a social wasp common in southeastern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Acrylamide, acetylcholine, acetonitrile, adenosine 3',5'-diphosphate (ADP), L-amino acid oxidase (type II from *Bothrops atrox* venom), ammonium persulfate, atropine, bradykinin, bromophenol blue, casein (bovine), cetyltrimethylammonium bromide, Coomassie brilliant blue R250, cyproheptadine, O-dianisidine, elastin-Congo red, glycerol, glycine, hyaluronic acid (human umbilical cord), L-leucine, N,N'-methylene-bis-acrylamide, molecular weight markers for SDS-PAGE, 4-nitro-3(octanoyloxy)benzoic acid, *p*-nitrophenyl phosphate, peroxidase, serotonin, sodium dodecylsulphate (SDS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), thymidine 5'-monophosphate *p*-nitrophenyl ester, thrombin, Trizma base and trypsin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 3-Hydroxy-4-nitrobenzoic acid was from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Sephacryl S200 HR was obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Hoe-140 was provided by Hoechst AG (Germany, Frankfurt) and sodium pentobarbitone (Sagatal®) was from Rhône Mérieux (Dublin, Ireland). All other reagents were of analytical grade and were purchased locally. Dessicated *Bothrops jararaca* snake venom was from a stock maintained in this laboratory.

Animals

Male Wistar rats (250-300 g) were supplied by the university's Central Animal Breeding Service.

Preparation of venom sac extract (VSE)

Colonies of *P. l. lanio* were collected locally and the wasps killed with CO gas and stored at -20°C. When a sufficient number had been collected, the wasps were thawed on ice and the venom sacs obtained by gently pulling on the sting with forceps so as to withdraw the venom apparatus. The venom sacs were subsequently separated from the stings. A VSE was prepared by gently stirring dissected venom glands in distilled water (approx. 200 sacs/20-30 ml) for 2 h at 4°C and then centrifuging the suspension to obtain a supernatant which was lyophilized and stored at -20°C. All amounts of VSE described below refer to the weight of lyophilized material.

Enzymatic activities

L-Amino acid oxidase

VSE (in 10 µl) was incubated for 15 min at 37°C in a solution consisting of 1.0 ml of peroxidase-O-dianisidine (2 mg of peroxidase and 10 mg of O-dianisidine per 100 ml of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8), 0.1 ml of substrate (7 mM L-leucine in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8) and Tris-HCl buffer in a final reaction volume of 1.5 ml. The reaction was stopped and the color developed by adding 0.74 ml of 50% HCl. The resulting absorbance was read against a blank at 530 nm [25]. The enzymatic activity was determined by reference to a standard curve of L-amino acid oxidase prepared using *Bothrops atrox* venom. One unit of activity corresponded to the degradation of 1 µmol of L-leucine/min under the above conditions.

Elastase

VSE was incubated for 24 h at 37°C in 4 ml of 0.02 M sodium borate buffer, pH 8.8, containing 1 mg of elastin-Congo red/ml. At the end of this period, the samples were centrifuged and the absorbance was determined at 495 nm [34]. Enzymatic activity was expressed as the increase in absorbance at 495 nm/mg VSE/24 h.

Hyaluronidase

A turbidimetric method [5] was used to assay hyaluronidase. The reaction mixture consisted of VSE (in 0.1 ml of 0.9% saline), 0.2 ml of a solution of hyaluronic acid (1 mg/ml of 0.2 M acetate buffer, pH 5.0, containing 0.15 M NaCl) and 0.2 ml of sodium acetate buffer. The mixture was incubated at 37°C for 15 min and the reaction stopped by adding 2 ml of cetyltrimethylammonium bromide solution (2.5% in 2% NaOH) followed by rapid mixing. The resulting turbidity was determined at 400 nm after incubation for 30 min at room temperature. One unit of enzymatic activity was defined as a 50% reduction in the turbidity caused by 200 µg of substrate.

Phosphatase

Acid phosphatase activity was measured by incubating VSE (in 0.1 ml) with 0.25 ml of substrate (4 mg p-nitrophenyl phosphate/ml, dissolved in citrate buffer) and 0.25 ml of 0.05 M sodium citrate, pH 4.8 at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 2.5 ml of 0.1 N NaOH and the absorbance read at 410 nm. For alkaline phosphatase activity, VSE (in 0.1 ml) was incubated with 0.125 ml of substrate (4 mg p-nitrophenyl phosphate/ml, dissolved in citrate buffer) and 0.125 ml of 1.0 M glycine-NaOH buffer, pH 10.4, containing 1 mM MgCl₂ at 37°C for 2 h. The reaction was stopped by adding 2.5 ml of 0.02 N NaOH and the absorbance read at 410 nm [33]. In both cases, one unit of activity corresponded to an absorbance increase of 1.0 at 410 nm.

Phosphodiesterase

Phosphodiesterase activity was determined by incubating VSE (in 0.1 ml) with a solution consisting of 0.1 M Tris-HCl, pH 8.9 (0.5 ml), 1 mM thymidine 5'-monophosphate ρ -nitrophenyl ester (0.6 ml) and distilled water (0.4 ml) at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by adding 1.5 ml of 0.05 N NaOH and the absorbance of the released ρ -nitrophenol read against a blank at 410 nm [33]. One unit of activity corresponded to an absorbance increase of 1.0 at 410 nm.

Phospholipase

VSE or appropriate chromatographic fraction (0.1 ml) was mixed with 1 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 10 mM CaCl₂ and 100 mM NaCl and placed on ice. One-hundred microliters of substrate (4-nitro-3(octanoyloxy)benzoic acid, 3.0 mM in acetonitrile) were then added followed by vortex mixing and incubation at 37°C for 20 min. The reaction was stopped by placing the tubes on ice and quickly adding 100 μ l of Triton X-100 (2.5% in distilled water) followed by vortex mixing for 5 s. The tubes were incubated at room temperature for 5-10 min prior to determining the absorbance at 425 nm [18]. To calculate the amount of product formed, the absorbances were compared with a standard curve of 3-hydroxy-4-nitrobenzoic acid. One unit of activity was defined as the release of 1 μ mol of product/min.

Protease

VSE (in 0.1 ml) was incubated with 1.9 ml of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, containing 1% bovine casein at 37°C for 20 min. The reaction was stopped by adding 5% (w/v) trichloroacetic acid followed by vigorous mixing and the tubes then incubated on ice for 30 min. Following centrifugation (2500 g, 15 min), the absorbance of the resulting supernatants was read at 280 nm [23]. One unit of enzyme activity corresponded to an increase of 0.001 absorbance units/min at 280 nm.

All absorbances were read on a Uvikon 810 spectrophotometer (Kontron, Italy) and the activities were expressed per mg of VSE. *Bothrops jararaca* snake venom was used as a positive control in all enzymatic assays

Chromatography

VSE (10-15 mg) was fractionated on a column (1.2 cm x 45 cm) of Sephacryl S200 HR equilibrated and eluted with 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0. Fractions of 1.0 ml were collected (Ultrarac model 2070, LKB Bromma, Uppsala, Sweden) at a flow rate of 12 ml/h, and the elution profile was determined by measuring the absorbance of the fractions at 280 nm (Uvikon 810 spectrophotometer). Individual fractions were tested for their hemolytic and phospholipase activities.

Electrophoresis

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was done using 15% gels [12]. VSE was diluted in 0.063 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 2% SDS, 10% glycerol and 0.001% bromophenol blue, then boiled for 4 min before electrophoresis at a fixed voltage (100 V) in a Mighty Small SE-260 mini-gel apparatus (Hoefer, CA, USA). The gels were fixed and stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R250 in ethanol:acetic acid:water (25:5:70, v/v), destained in methanol:acetic acid:water (10:7:83, v/v) and dried as described elsewhere [21]. Protein molecular weight markers were included in all runs.

Biological activities

Coagulant activity

Blood from healthy human donors was collected into 3.8% (w/v) sodium citrate (1:9, v/v) and then centrifuged at 2,500 g for 15 min at room temperature to provide plasma. VSE was diluted in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The assay was performed by adding 50 µl of VSE solution or *B. jararaca* snake venom (positive control) to 100 µl of plasma preincubated at 37°C for 3 min and recording the time required for clot

formation [10]. If no clot formed within 5 min, 150 μ l of 0.025 M CaCl_2 was added to the above mixture and the clotting time then determined.

Hemagglutination

Hemagglutinating activity was determined using trypsinized, formaldehyde-fixed dog and human erythrocytes [26]. The wells of the hemagglutination plate contained 50 μ l of a 3-4% suspension of erythrocytes in PBS (pH 7.4) and 50 μ l of VSE (diluted in PBS) or *Bothrops jararaca* snake venom (positive control). The negative control consisted of 50 μ l of cell suspension and 50 μ l of PBS. Hemagglutination was determined after a 2 h incubation at room temperature. Unagglutinated erythrocytes formed a characteristic button at the bottom of the well whereas agglutinated erythrocytes formed a diffuse mat.

Hemolysis

The direct hemolytic activity of VSE was assayed using a 5% suspension of human washed erythrocytes in PBS (pH 7.4) [13]. Total hemolysis (positive control) was obtained by lysing erythrocytes in distilled water. The negative control consisted of erythrocytes (5%) suspended in PBS. After incubation, samples and controls were centrifuged at 1000 g for 10 min and the absorbance of the supernatants was measured at 540 nm. The $A_{540\text{nm}}$ readings for the negative and positive controls corresponded to 0% and 100% hemolysis, respectively. A standard curve of hemolysis (prepared by serial dilution of the 100% hemolysis solution) was then used to calculate the extent of hemolysis (%) caused by VSE.

Platelet aggregation

Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) were prepared from the blood of individuals who had not been on any medication for the previous 10 days. PRP and PPP were obtained by standard differential centrifugation and washed platelets (WP) were prepared as described [30]. For each test, 0.5 ml of platelet suspension was incubated with stirring for 3 min in a Payton two-channel aggregometer. Subsequently, varying

amounts of VSE (50-400 ug/20 μ l) were added and the aggregatory response followed for 3-5 min. In the absence of any aggregatory response, ADP (3-10 μ M, for PRP) or thrombin (20-100 mU/ml, for WP) was subsequently added and the aggregation monitored for a further 4 min. Control responses to ADP and thrombin were obtained for all platelet preparations.

Smooth muscle contracting activity

The ability of VSE to contract non-vascular smooth muscle was assayed using the rat ileum. Male Wistar rats were euthanized with sodium pentobarbitone (Sagatal[®], >50 mg/kg) and portions of the ileum removed, cleaned of adherent tissue and fat and suspended in a 5 ml tissue bath containing Tyrode solution (composition in mM: CaCl₂ 1.8, KCl 2.7, MgCl₂ 0.49, NaCl 137, NaHCO₃ 11.9, NaH₂PO₄ 0.42 and glucose 5.55) at 37°C. The preparations were suspended under a resting tension of 1.0 g and were aerated with 95%O₂-5%CO₂. Isotonic muscle contractions were recorded via a Grass Metripak isotonic force transducer coupled to a 4-channel Gould recorder (model 35 V7404-10, Gould Instruments, Cleveland, OH, USA). The tissues were allowed to stabilize for 20-30 min until a consistent baseline was obtained. VSE and drugs were added to the bath in volumes of 0.01-0.1 ml. In all cases, substances were left in contact with the tissue for 1-3 min after which the preparation was washed twice before the next test. When antagonists were used, the contact time was increased to 20 min prior to testing VSE. In the latter experiments, only one antagonist was tested per preparation.

Statistical analysis

Student's t-test was used to compare differences between groups. A p value <0.05 was considered to indicate significance.

RESULTS

Table 1 shows that *P. l. lanio* VSE contained low levels of acid and alkaline phosphatase, L-amino acid oxidase, elastase and phosphodiesterase, moderate amounts of hyaluronidase and protease and a high quantity of phospholipase. VSE (50-200 µg) did not coagulate human citrated plasma (clotting time >300 s) whereas *B. jararaca* snake venom (50 µg, positive control) coagulated citrated plasma within 10-15 s. At the same concentrations as above, the VSE prolonged the plasma recalcification time with 25 mM CaCl₂ from 2.4 ± 0.5 min to 5.9 ± 0.2 min (n=3). Dog and human erythrocytes were not agglutinated by VSE at concentrations up to 250 µg/well (2.5 mg/ml, n=3). In contrast, *B. jararaca* venom (positive control) agglutinated erythrocytes from both species at a concentration of 0.39 µg/well (3.9 µg/ml, n=3). VSE exerted a potent, dose- and time-dependent direct hemolytic action on human washed erythrocytes (Fig. 1).

SDS-PAGE of VSE in 15% gels revealed the presence of more than 10 components with MW ranging from 14,000-100,000; two particularly prominent bands were observed at approximately 30 and 16 kDa (Fig. 2). Chromatography of VSE on Sephacryl S200 HR was done with three different lots, and resulted in seven peaks (Fig. 3A), although there was some variation in the relative proportions of each peak (Fig. 3B). In all cases, however, the first peak contained the hemolytic and phospholipase activities.

VSE produced weak, dose-dependent aggregation of human platelets in PRP; the extent of this aggregation varied among the lots of VSE tested. In WP, VSE alone did not produce aggregation at concentrations up to 400 µg/ml, but markedly potentiated the response to non-aggregatory doses of thrombin (10-20 mU/ml) at concentrations of 2-10 µg/ml (Fig. 4).

VSE caused rapid, dose-dependent contraction of the rat isolated ileum (Fig. 5). Preincubating the tissue with the muscarinic antagonist atropine (0.6 µg/ml) or the (mainly) serotonergic antagonist cyproheptadine (0.2 µg/ml) had little effect on these responses whereas the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe 140 (1 µg/ml) completely abolished the contractions (Fig. 6).

DISCUSSION

The levels of enzymatic activities in *P. l. lanio* VSE, i.e. high phospholipase and moderate to low amounts of hyaluronidase, phosphodiesterase and protease, generally agreed with those reported for other vespids, including the related species *P. infuscatus* and *P. annularis* [33]. In contrast, the venoms of some social wasps such as *Dolichovespula maculata* (a North American wasp) and *Apoica pallens* (a polistine wasp) have low amounts of PLA₂ [33].

Hymenopteran venoms generally have little or no proteolytic activity. Indeed, whereas proteases are common in snake venoms and have an important role in the effects of envenoming, these enzymes are not considered to be of great importance in insect venoms [32]. The presence of proteases (and possibly phosphodiesterase) in pure hymenopteran venoms may indicate contamination from other sources, particularly when venom sac extracts are used [33]. The latter authors found no proteolytic activity in the venoms of *P. infuscatus*, *P. annularis*, *Polybia serica* and *A. pallens* when assayed at pH 7.0 or pH 9.2.

A potent direct hemolytic action is common in wasp venoms [17, 20, 29], and *P. l. lanio* VSE was no exception. The direct and indirect hemolytic activity of honey bee (*A. mellifera*) venom is attributed to mellitin and PLA₂, respectively [11]. The hemolytic properties of social wasp venoms are associated with PLA₂, but also with mastoparans which can produce local edema and cardiovascular alterations [15, 16]. The PLA₂ in wasp venoms can produce a variety of pharmacological effects, including smooth muscle contraction, hypotension, and an increase in capillary permeability, probably as a result of the release of histamine following mast cell degranulation [2, 8]. The direct hemolytic activity of *Vespa orientalis* venom is associated with a thermolabile, nondialyzable basic peptide, and the indirect hemolytic activity, with a relatively thermostable component probably associated with PLA₂ and PLB activities [20]. Although the hemolytic activity of *P. l. lanio* VSE eluted in the same peak as the PLA activity during gel filtration, we have not yet established whether the latter activity is responsible for this hemolysis.

The chromatographic profiles of three lots of VSE (prepared from wasps collected from colonies at different locations) showed that while they were qualitatively similar, there were quantitative variations in the relative proportions of the principal peaks obtained. We have not systematically investigated the occurrence of individual, nest-to-nest or seasonal variations in the biochemical and biological activities of VSE. Indeed, compared to snake venoms [4], the influence of age, season, geographic origin and other similar factors on the composition and activities of hymenopteran venoms has been poorly studied. The electrophoretic profile of *P. l. lanio* VSE showed a greater number of high MW proteins than reported for other *Polistes* venoms [36].

Little is known of the action of hymenopteran venoms on platelet aggregation. The platelet aggregatory effect of *Solenopsis invicta* ant venom was attributable to the presence of piperidines [19]. The venom of the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus* inhibited platelet aggregation induced by arachidonic acid [14], probably by preventing the pro-aggregatory action of thromboxane A₂, an arachidonic acid metabolite, and potent agonist for platelet aggregation. The weak aggregation induced by *P. l. lanio* VSE in PRP may be related to the PLA activity, although this remains to be confirmed. Similarly, the mechanism for the potentiation of thrombin-induced aggregation in WP has yet to be clarified.

Wasp venoms contain a variety of potent biologically active compounds such as acetylcholine, biogenic amines (histamine, serotonin) and peptides (kinins and mastoparans) [6] which act on smooth muscle in a variety of organs. Thus, *Vespa crabro* venom exerted an acetylcholine-like activity in the frog rectus abdominis [8], and *V. orientalis* venom contracted bronchial and smooth muscle preparations, principally through the presence of biogenic amines and kinins [7]. *Polistes* sp venom was reported to have a long-lasting, positive inotropic action on frog isolated heart [8]. In the present study, *P. l. lanio* contracted isolated rat ileum. The lack of effect of atropine (an acetylcholine muscarinic receptor antagonist) and cyproheptadine (a mainly serotonin receptor antagonist) on the response of the isolated ileum to *P. l. lanio* VSE indicates that this extract is devoid of acetylcholine and serotonin. In contrast, the inhibition of the contractile response to VSE by the bradykinin B₂ receptor antagonist Hoe-140 indicates the presence

of a kinin(s). Vespid venoms are a rich source of kinins [30] which are among the most pharmacologically active low molecular weight components of these venoms.

In conclusion, these results indicate that the composition of *P. l. lanio* venom is very similar of that of other *Polistes* species and that of wasp venoms in general.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mr. José Ilton dos Santos for his technical help, Dr. Vera Letícia Machado (Department of Zoology, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil) for identifying the wasps, Dr. Ronilson A. Moreno for providing some of the insects, Dr Edson Antunes for the gift of Hoe-140 and Dr. Julia Prado-Franceschi for the use of her laboratory and some equipment. M.P.B. is the recipient of a CAPES (Brazil) studentship.

REFERENCES

- 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;27:683-688.
- Akre R, Reed HC. Biology and distribution of social hymenoptera. In: Tu AT editor. *Insect and arthropod venoms*. New York: Marcel Dekker, 1986:3-29.
- Cascone O, Amaral V, Ferrera P, Vita N, Guillemot JC, Días LE. Purification and characterization of two forms of antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom. *Toxicon* 1995;33:659-665.
- Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 1998;36:823-846.
- Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem* 1956;220:303-306.
- Dohtsu K, Okumura K, Hagiwara KL, Palma MS, Nakagima T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Prionyx sylvestris* (Hymenoptera, Vespidae). *Nat Toxins* 1993;1:271-276.
- Edery H, Ishay J, Gitter S. Pharmacological activity of oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom. *Toxicon* 1972;10:13-23.
- Edery H, Ishay J, Gitter S, Joshua H. Venoms of vespidae. In: Bettini S, editor. *Arthropod venoms*. Vol. 48 *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer, 1978:693-679.
- Fletcher JE, Elliott WE, Ishay J, Rosenberg P. Phospholipase A and B activities of reptiles and hymenoptera venoms. *Toxicon* 1979;15:141-156.

- Gené JÁ, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1989;27:841-848.
- Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972;177:314-322.
- Hames BD. One-dimensional polyacrylamide gel-electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D, editors. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. 2nd ed. Oxford: IRL Press, 1990:1-147.
- Hink WF, Pappas PW, Jaworski DC. Partial biochemical characterization of venom from the ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* 1994;32:763-772.
- Hink WF, Romstedt KJ, Burke JW, Doskotch RW, Feller DR. Inhibition of human platelet aggregation and secretion by ant venom and a compound isolated from venom. *Inflammation* 1989;13:175-184.
- Ho CL, Hwang LL. Local edema induced by the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom and its components. *Toxicon* 1991;29:1033-1042.
- Ho CL, Hwang LL, Lin YL, Chen CH, Yu HM, Wang KT. Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requirements. *Eur J Pharmacol* 1994;259:259-264.
- Ho CL, Ko JL. Hornetin: the letal protein of the hornet (*Vespa flavitarsus*) venom. *FEBS Lett* 1986;209:18-22.
- Holzer M, Mackessy SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 1996;43:1149-1155.

- Javors MA, Zhou W, Maas JW, Han S, Keenan RW. Effects of fire ant venom alkaloids on platelet and neutrophil function. *Life Sci.* 1993;53:1105-1112.
- Joshua H, Ishay J. Factors affecting the hemolytic activity of the oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom and venom sac extracts. *Toxicon* 1977;15:247-250.
- Juang RH, Chang YD, Sung JC. Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in a cellophane sandwich. *Anal. Biochem.* 1994;141:348-350.
- Kornberg A, Kaufman S, Silver L, Ishay J. Effect of venom sac extract of the oriental hornet (*Vespa orientalis*) on coagulation factors. *Toxicon* 1988;12:1169-1176.
- Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J Gen Physiol* 1947;32:291-310.
- Nakajima T. Biochemistry of vespid venoms. In: Tu AT, editor. *Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms. Vol. 2 Handbook of natural toxins.* New York: Marcel Dekker, 1984:110-133.
- Nicholson JA, Young SK. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 1975;63:110-117.
- Nowak TP, Haywood PL, Barondes SH. Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscles and a myogenic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;68:650-657.
- Oliveira MR, Palma MS. Polybitoxinas: a group of phospholipase A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). *Toxicon* 1998;36:189-99.
- Perianin A, Snyderman R. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol trisphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1989;143:1669-1673.

- Piek T. Pharmacology of Hymenoptera venoms. In: Tu AT, editor. Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms. Vol. 2 Handbook of natural toxins. New York: Marcel Dekker, 1984:135-186.
- Piek T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon* 1991;29:139-149.
- Radomski MW, Moncada S. An improved method for washing human platelets with prostacyclin. *Thromb Res* 1983;30:383-389.
- Schmidt JO. Proteolytic activities of hymenoptera venoms. *Annu Rev Ent* 1982; 27:339-368.
- Schmidt JO, Blum MS, Overal WL. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon* 1986;24:907-921.
- Shotton DM. Elastase. *Meth Enzymol* 1970;19:113-117.
- Wheeler-Jones CPD, Saermark T, Kakkar VV, Authi KS. Mastoparan promotes exocytosis and increases intracellular cyclic AMP in human platelets. *Biochem J* 1992;281:465-472.
- Wood CL, Hoffman DR. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Hymenoptera venom and venom sac extracts. *Toxicon* 1983;21:291-299.
- Yasuhara T, Mantel P, Nakajima T, Piek T. Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp *Megascolia flavifrons*. *Toxicon* 1987;25:527-535.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Dose- (A) and time- (B) dependent direct hemolysis of human washed erythrocytes by *Polistes lanio lanio* VSE.

Direct hemolytic activity was assayed by incubating a suspension of human washed erythrocytes (5% in PBS) with various concentrations of VSE or with a fixed concentration of VSE for different times at 37°C. After incubation, the samples were centrifuged and the extent of hemolysis (%) was then determined by comparing the $A_{540\text{ nm}}$ of the supernatants with a standard curve of hemolysis prepared in distilled water. In A, the hemolysis was determined after a 2 h incubation. The columns represent the mean $\pm$ S.E.M. of three experiments with one lot of VSE. In B, the points represent the mean $\pm$ S.E.M. for three lots of VSE.

FIGURE 2. Electrophoretic (SDS-PAGE) profile of *P. l. lanio* VSE.

VSE (150 μ g) was run at 100 V in 15% polyacrylamide gels which were then stained as described in Methods. The marker proteins were: *Escherichia coli* β -galactosidase 116 kDa, phosphorylase b (rabbit muscle) 97.4 kDa, bovine serum albumin 66 kDa, ovalbumin 45 kDa, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 36 kDa, carbonic anhydrase (bovine erythrocytes) 29 kDa, trypsinogen 24 kDa, trypsin inhibitor 20 kDa and α -lactalbumin 14.2 kDa.

FIGURE 3. Elution profile of *P. l. lanio* VSE on Sephacryl S 200 HR.

A: VSE (15 mg) was fractionated on a column (1.2 cm x 45 cm) of Sephacryl S200 HR equilibrated with 0.02 M Tris-HCl, pH 8. Fractions of 1 ml were collected at a flow rate of 12 ml/h and assayed for hemolytic and phospholipase activities. Similar results were obtained in two additional experiments. B: Variation in the relative proportions of the principal peaks obtained following fractionation of different lots of VSE on Sephacryl S200 HR as described above. The variation is expressed as a percent of the total protein recovered (based on the absorbance at 280 nm).

FIGURE 4. Human platelet aggregation responses to *P. l. lanio* VSE in PRP (A) and WP (B).

Platelet aggregation was performed as described in Methods. The traces are representative of at least three experiments for each preparation and concentration. PRP: platelet-rich plasma. WP: washed platelets. T: thrombin.

FIGURE 5. Contractile effect of *P. l. lanio* VSE on rat isolated ileum.

The ileum was removed from rats euthanized with sodium pentobarbital and mounted as described in Methods. VSE was added to the organ bath after 20-30 min for stabilization. The columns are the mean $\pm$ S.E.M. of three experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to 16 μ g.

FIGURE 6. Kinins are responsible for the contractile action of *P. l. lanio* VSE on rat isolated ileum.

The ileum was removed from rats and mounted as described in Methods. Panel A: Ach, acetylcholine (8 ng/ml); A, atropine (0.6 μ g/ml). Panel B: C, cyproheptadine (0.2 μ g/ml); Ser, serotonin (3.2 μ g/ml). Panel C: Bk, bradykinin (62.5 ng/ml); Hoe-140 (1 μ g/ml). In all cases, the concentration of VSE was 4 μ g/ml. Similar results were obtained in two additional experiments.

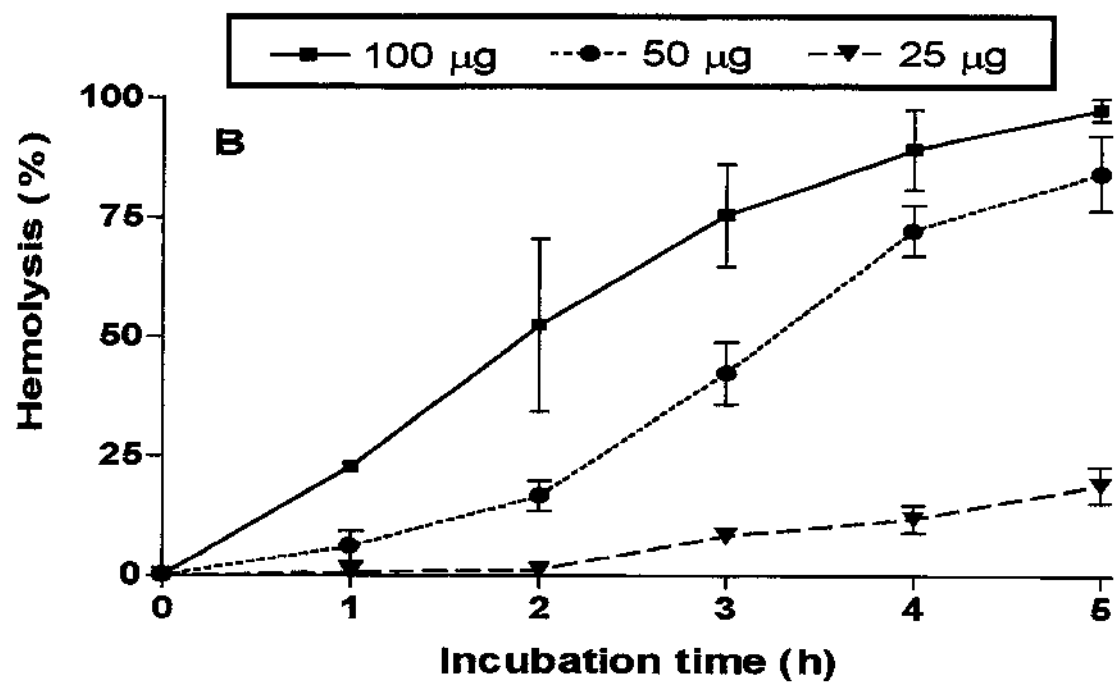
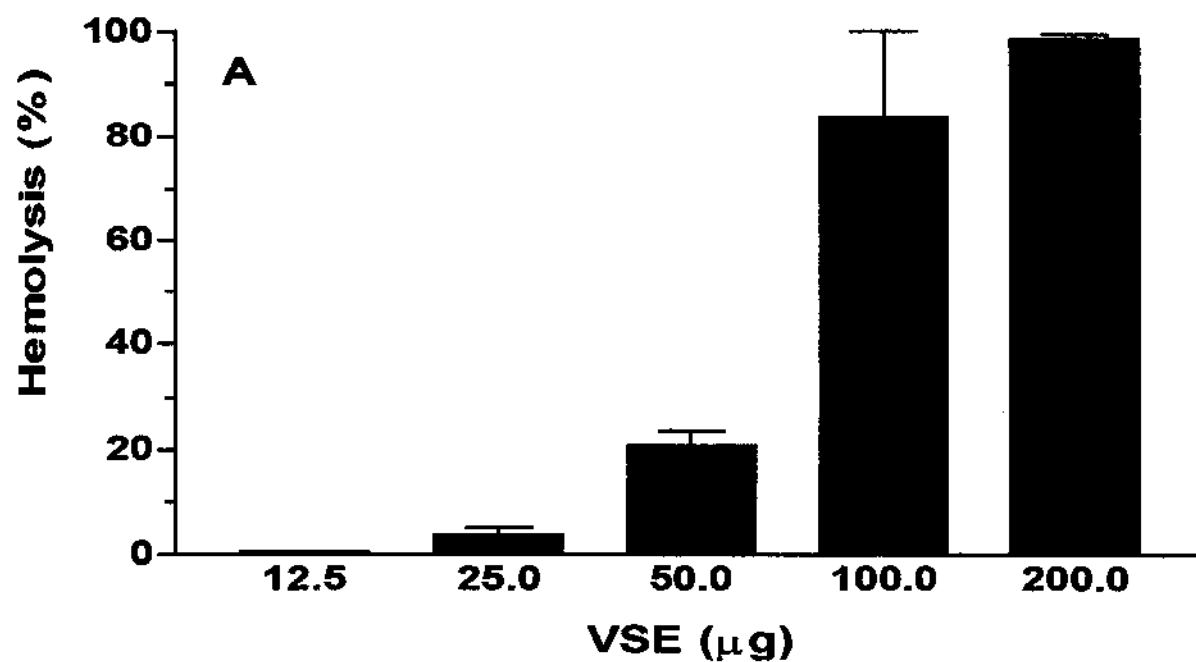


FIGURA T 1

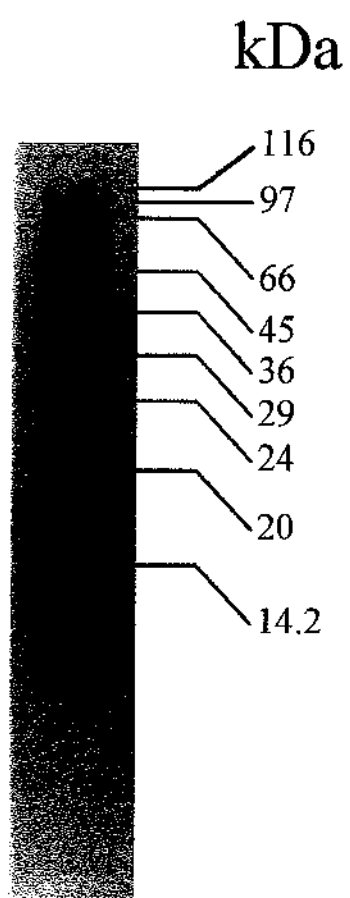


FIGURA T 2

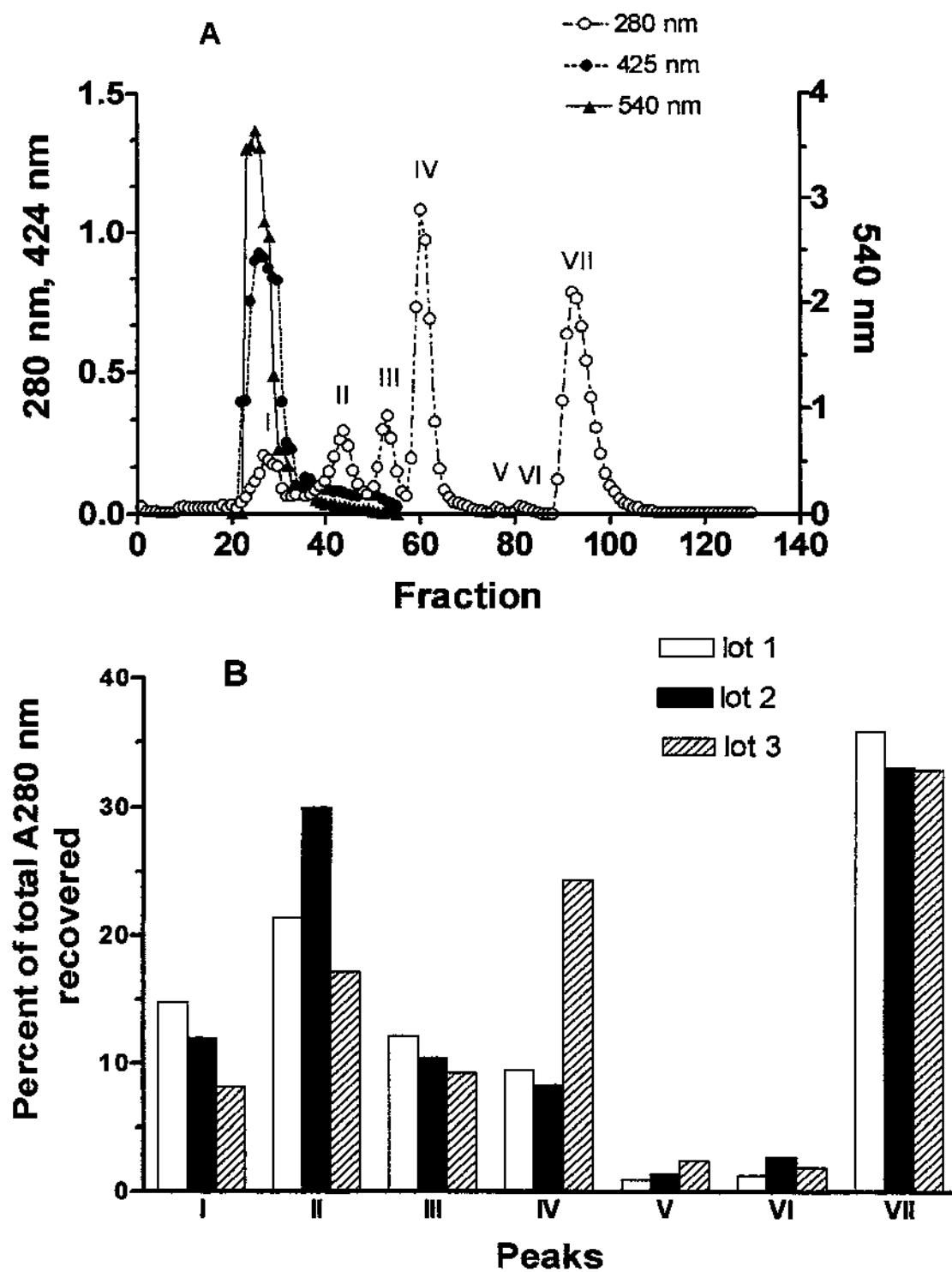


FIGURA T 3

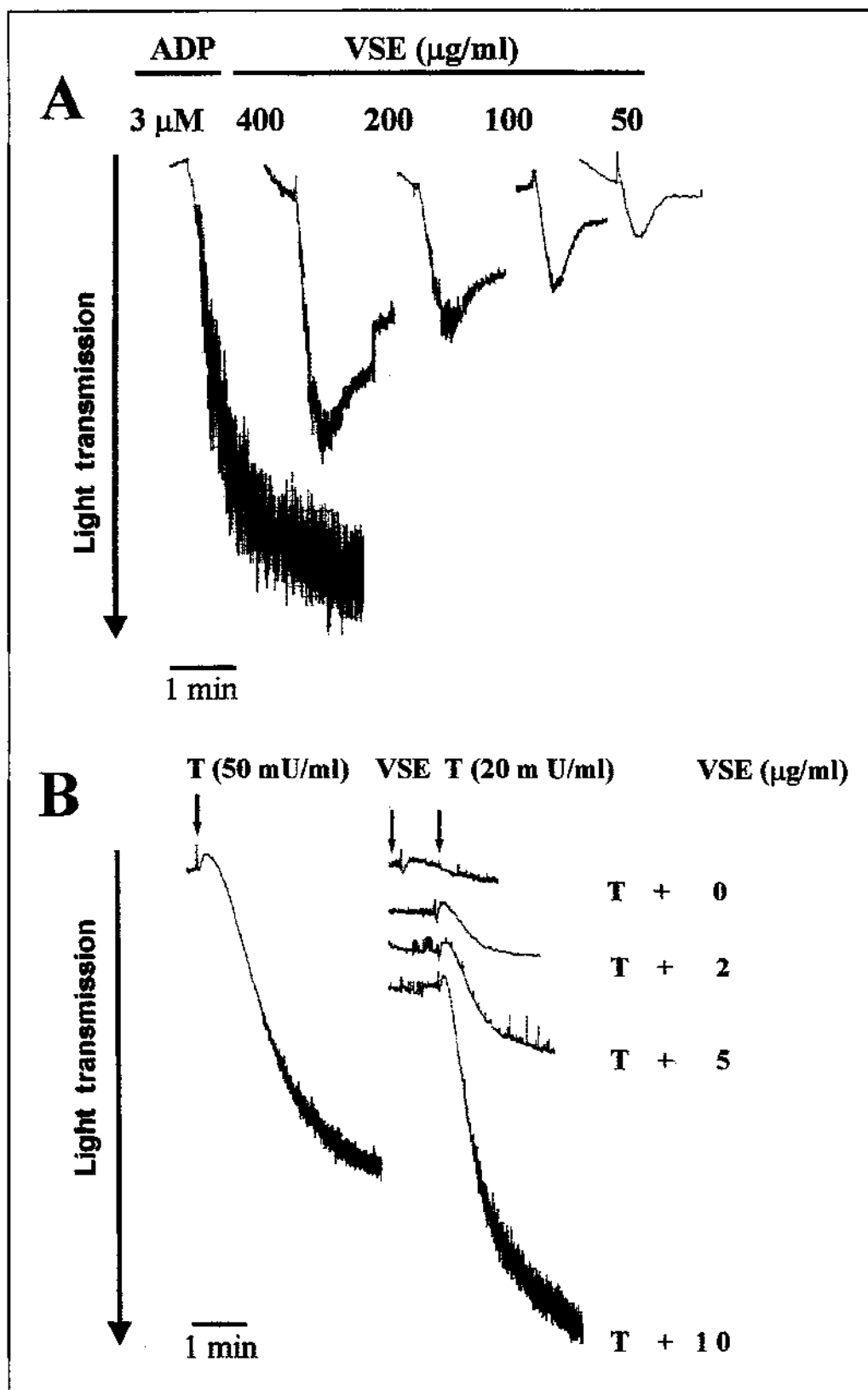


FIGURA T4

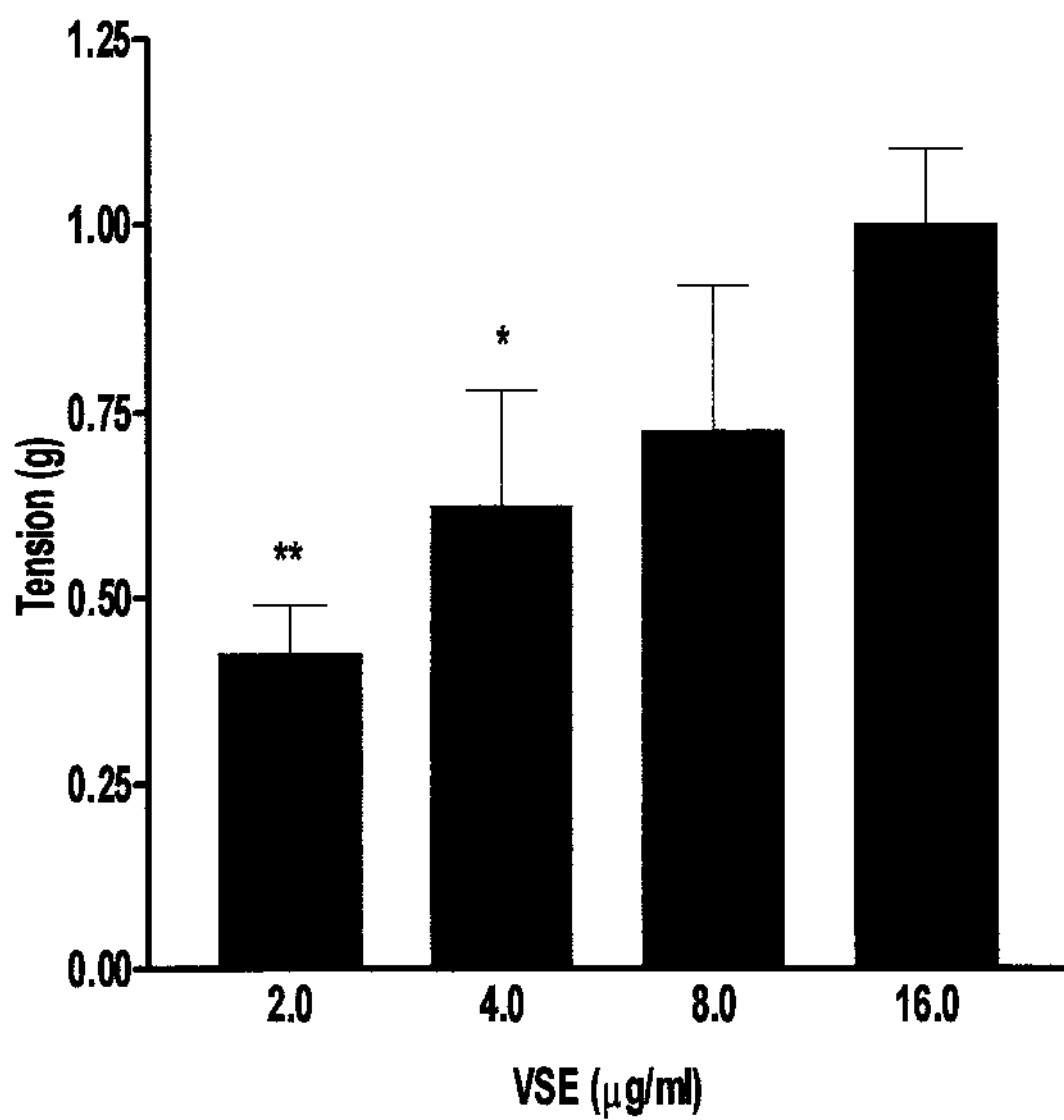


FIGURA T 5

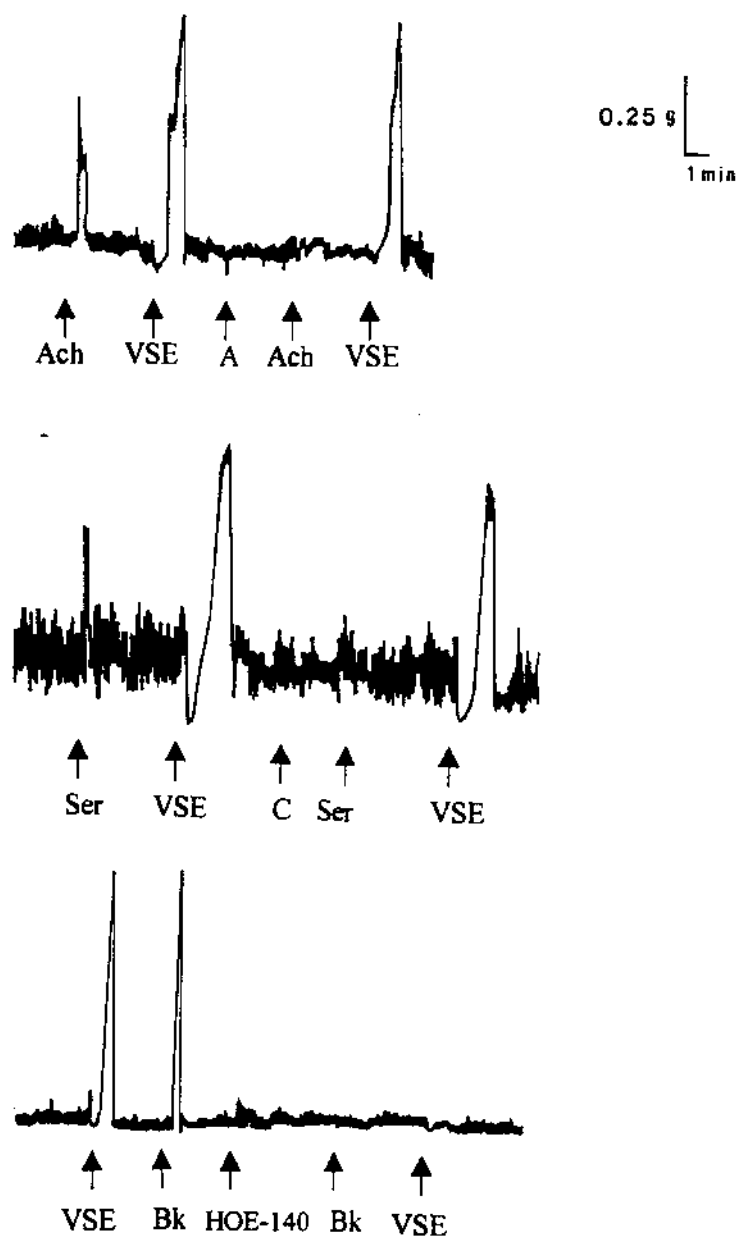


FIGURA T 6

TABLE 1. Enzymatic activities of *P.L. lamio* VSE.

Activity	Units/mg VSE
Acid phosphatase	0.20 ± 0.03
Alkaline phosphatase	0.018 ± 0.001
L-Amino acid oxidase	$0.120 \pm 0.001^*$
Elastase	$0.134 \pm 0.007^{**}$
Hyaluronidase	44.5 ± 6.3
Phosphodiesterase	0.44 ± 0.01
Phospholipase	241.6 ± 26.3
Protease	38 ± 1.8

The values represent the mean $\pm$ SEM of three determinations. For definition of units, see Methods.

* mU/ml . ** A_{495nm}/mg VSE/24 h.

3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

As atividades enzimáticas observadas no ESV de *P. lanio*, ou seja, alta atividade fosfolipásica, níveis moderados de hialuronidase e protease e baixa atividade de enzimas como fosfodiesterase e fosfatases coincidem com observações para outros venenos de vespas (Hoffman, 1985a; Schmidt *et al.*, 1986). Devido à sua importância antigênica, a hialuronidase e a fosfolipase têm sido as enzimas mais estudadas e isoladas em venenos de vespas sociais (King *et al.*, 1978; Hoffman, 1985a, b). Porém, Reisman *et al.* (1982) observaram que o veneno obtido por estimulação elétrica é mais potente que o extrato de sacos de veneno quanto à sua antigenicidade. O extrato de sacos de veneno contém proteínas corporais que não estão presentes no veneno puro obtido por estimulação elétrica. Existe uma variação antigênica entre diferentes espécies de *Polistes*, e que pode estar relacionada à alimentação, estação do ano e idade do animal (REISMAN, LITTER, WYPYCH, 1984). Em experimentos para avaliar a reação cruzada entre diferentes espécies de vespas, os anticorpos produzidos contra venenos de *Polistes* reagiram apenas com venenos do mesmo gênero, não havendo reatividade contra outros gêneros como *Vespa* e *Dolichovespula* (Reisman *et al.*, 1982).

A atividade proteolítica parece não estar presente nos venenos de vespas devido principalmente à função defensiva que este apresenta (Schmidt *et al.*, 1986) e que difere da função digestiva como os venenos de serpentes, por exemplo.

Os venenos de vespas apresentam uma alta atividade hemolítica (Ho & Ko, 1986; Ho *et al.*, 1996). As hemolisinas estão presentes em muitos dos venenos de himenópteros. Uma das hemolisinas mais estudadas é a melitina, um peptídeo presente no veneno de *Apis mellifera*. Com sua estrutura anfifílica (de um lado uma porção altamente apolar e do outro lado da cadeia uma porção básica e polar), a melitina interage com membranas lipídicas formando micelas. Sua ação surfactante faz deste peptídeo uma das mais potentes hemolisinas encontradas em venenos de himenópteros (SCHMIDT, 1982). Um peptídeo semelhante é encontrado no veneno de formigas do gênero *Pogonomyrmex* que, como a melitina, também é básico (Blum, 1984). A *Vespa basalis* (encontrada em Taiwan) possui uma toxina que causa hemólise severa resultando em hipercalemia e disfunção cardíaca que pode levar à morte (Ho & Ko, 1988). No caso do veneno de *Vespa orientalis*, a atividade hemolítica direta está associada com um peptídeo básico termolábil,

e a atividade indireta com as fosfolipases A₂ e B (Joshua & Ishay, 1977). Em abelhas, a atividade hemolítica direta é atribuída à melitina, enquanto que a fosfolipase A₂ é responsável pela atividade hemolítica indireta (Habermann, 1972). O veneno de *P. l. lanio* possui alta atividade hemolítica direta, porém embora a atividade hemolítica esteja presente no mesmo pico de eluição que a atividade fosfolipásica, não é possível afirmar se estas duas atividades estão relacionadas.

O perfil eletroforético do extrato de sacos de veneno de *P. l. lanio* mostrou um grande número de proteínas de alto peso molecular, como também foi observado no veneno de outras espécies de *Polistes* (Wood & Hoffman, 1983).

O perfil cromatográfico do ESV de *P. l. lanio* mostrou ser qualitativamente similar entre os três lotes de ESV usados (preparados de vespas coletadas em diferentes locais e ninhos). Porém houve variações quantitativas nos picos obtidos.

Pouco se sabe sobre a ação dos venenos de himenópteros na agregação plaquetária. Javors *et al.* (1993) demonstraram que o veneno da formiga *Solenopsis invicta* (lava-pés) causa agregação plaquetária devido à presença de um alcalóide (piperidina). O veneno da formiga tropical *Pseudomyrmex triplarinus* inibe a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (Hink *et al.*, 1989), talvez por bloquear a ação pró-agregante do tromboxano A₂, um metabólito do ácido araquidônico, que é um potente agonista de agregação plaquetária. No caso de *P. l. lanio* a agregação fraca induzida pelo ESV pode estar relacionada à atividade fosfolipásica embora isso ainda tenha que ser confirmado, como também o mecanismo de potencialização da atividade agregante da trombina.

Venenos de vespas contêm uma grande variedade de compostos biologicamente ativos como a acetilcolina, aminas biogênicas (histamina e serotonina) e polipeptídeos (cininas), os quais são capazes de contrair músculo liso em uma variedade de preparações isoladas, além da sua ação hipotensiva e algogênica. Todas as cininas isoladas de venenos de vespas tem grande homologia estrutural com a bradicinina. Um fator que determina a atividade das cininas é a sua basicidade. A 'polistiscinina' que possui seis resíduos básicos e nenhum resíduo ácido nos seus dezoito aminoácidos é dez vezes mais ativa na indução de

liberação de histamina de mastócitos que a bradicinina (um peptídeo rico em prolina e que possui uma amina no C-terminal) (Schmidt, 1982; Johnson & Erdős, 1973).

Além da basicidade, a posição dos aminoácidos na cadeia também pode alterar a atividade das cininas. Em ensaios utilizando-se Thr⁶-BK, foi observado que esta molécula é dez vezes mais potente que a BK no bloqueio da transmissão sináptica no sistema nervoso central de insetos (Piek *et al.*, 1987). A presença de cininas em venenos de vespas sociais é um fator que contribui para a produção de dor em vertebrados, já a sua presença em vespas solitárias indica uma ação neurotóxica em insetos, uma vez que o veneno é introduzido no gânglio nervoso, causando a paralisia da presa (Piek, 1991; Yasuuhara *et al.*, 1987; Piek *et al.*, 1993).

A ausência do efeito da atropina (antagonista da acetilcolina em receptores muscarínicos) e da ciproheptadina (antagonista da serotonina) na resposta contrátil do ESV de *P. l. lanio* sugere que o veneno desta espécie é destituído de acetilcolina e serotonina. Porém, a inibição da resposta contrátil do ESV de *P. l. lanio* causado pelo Hoe-140 (antagonista dos receptores B₂ da bradicinina) indica que o extrato é rico em cininas, o que está de acordo com estudos anteriores (Piek, 1991; Pisano, 1970).

Concluindo, nossos resultados indicam que a composição do ESV de *P. l. lanio* é muito similar ao de outras espécies de *Polistes* e de outros venenos de vespa.

1. The first part of the paper discusses the importance of the
2. second part of the paper discusses the importance of the
3. third part of the paper discusses the importance of the
4. fourth part of the paper discusses the importance of the
5. fifth part of the paper discusses the importance of the
6. sixth part of the paper discusses the importance of the
7. seventh part of the paper discusses the importance of the
8. eighth part of the paper discusses the importance of the
9. ninth part of the paper discusses the importance of the
10. tenth part of the paper discusses the importance of the

4.SUMMARY

Hymenopteran venoms contain enzymes, peptides, amines and excitatory amino acids. We have examined the enzymatic and biological activities of an aqueous venom sac extract (VSE) from the Brazilian social wasp *Polistes lanio lanio*. The VSE had low phosphodiesterase, elastase, acid and alkaline phosphatase and L-amino acid oxidase activities, moderate levels of hyaluronidase and protease and high phospholipase activity. SDS-PAGE revealed the presence of several components with molecular weights of 14,000-100,000. Gel filtration of VSE resulted in seven peaks, the first of which contained the hemolytic and phospholipase activities. The VSE exhibited potent direct hemolytic activity on human erythrocytes which was dose- (12.5-200 µg/ml) and time- (up to 5 h) dependent. VSE (50-400 µg/ml) produced weak, dose-dependent aggregation of human platelet-rich plasma and did not aggregate human washed platelets (400 µg/ml), but potentiated the responses to non-aggregatory doses of thrombin. Dog and human erythrocytes were not agglutinated by VSE (2.5 mg/ml). In the rat isolated ileum, VSE (4-16 µg/ml) produced contractions which were not prevented by atropine (muscarinic receptor antagonist, 0.6 µg/ml) or cyproheptadine (histamine and serotonin receptor antagonist, 0.2 µg/ml), but were abolished by the bradykinin B₂ receptor antagonist HOE-140 (1 µg/ml), suggesting the presence of kinins. These results indicate that the composition of *P. l. lanio* VSE is similar to that of other wasp species.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akre, R.D. – Social wasps. In: **Social Insects**. Vol. 4. (Hermann HR, ed.). Academic Press: New York, 1982.
- Akre R.D. & Reed H.C. - Biology and distribution of social hymenoptera. In: **Insect and Arthropod Venoms**. Vol 4. Handbook of Natural Toxins. (Tu AT, ed.). Marcel Dekker: New York, 1984, pp. 3-29.
- Barr-Nea L., Rosenberg P., Ishay J. - The venom apparatus of *Vespa orientalis*: morphology and cytology. **Toxicon** **14**: 65-68, 1976.
- Blum M.S. - Ant venoms: chemical and pharmacological properties. **J. Toxicol. Toxin. Revs.** **11**: 115-164, 1992.
- Blum M.S. - Poisonous ants and their venoms. In: **Insect and Arthropod Venoms**. Vol 4. Handbook of Natural Toxins. (Tu AT, ed.). Marcel Dekker: New York, 1984, p. 225-242.
- Cascone O., Amaral V., Ferreira P., Vita N., Guillemot J.C., Diaz L.E. - Purification and characterization of two forms of antigen 5 from *Polybia scutellaris* venom. **Toxicon** **33**: 659-665, 1995.
- Condrea E. & De Vries A. - Venom phospholipase A: a review. **Toxicon** **2**: 261-265, 1965.
- Costa H. - Biochemical characterization of the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera-Vespidae). **J. Venom. Anim. Toxins** **3**: 50, 1997.

- Deshazo R., Butcher B.T., Banks W.A. - Reactions to the stings of the imported fire ant. *N. Engl. J. Med.* **323**: 462-466, 1990.
- Edery H., Ishay J., Gitter S. - Pharmacological activity of oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom. *Toxicon* **10**: 13-23, 1972.
- Edery H., Ishay J., Gitter S., Joshua H.- In: **Handbook of Experimental Pharmacology. Arthropod Venoms**. Vol 48. (Bettini S, ed.).Springer Verlag: Berlin. 1978. p 691-771.
- Eldefrawi M.E., Anis N.A, Eldefrawi A T.- Glutamate receptor inhibitors as potential insecticides. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **22**: 25-39, 1993.
- Evans, H.E. & West-Eberhard, M.J. - **The Wasps**. University of Michigan Press: Ann Arbor. 1970.
- Fletcher J.E., Elliott W.B., Ishay J., Rosenberg P. - Phospholipase A and B activities of reptile and Hymenoptera venoms. *Toxicon* **15**: 141-156, 1979.
- Geller R.G., Yoshida H., Beaven M.A, Horakova Z., Atkins F.L., Yamabe H., Pisano J.J.- Pharmacologically active substances in venom of the bald faced hornet, *Vespula (Dolichovespula) maculata* and the yellow jacket *Vespula (Vespula) maculifrons*. *Toxicon* **14**: 27-33, 1976.
- Giannotti E. Estudos biológicos e etológicos da vespa social neotropical *Polistes (Aphanilopterus) lanio lanio* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera, Vespidae), Rio Claro, SP. 1992. [Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista].

- Gobbi N., Zucchi R. - On the ecology of *Polistes versicolor versicolor* (Olivier) in southern Brazil (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). I. Phenological account. **Naturalia**, **5**: 97-104, 1980.
- Gobbi, N., Zucchi R. - On the ecology of *Polistes versicolor versicolor* (Olivier) in southern Brazil (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). II. Colonial productivity. **Naturalia**, **10**: 21-25, 1985.
- Habermann E. - Bee and wasp venoms. **Science** **177**: 314-322, 1972.
- Heinrich B. **Bumble Bee Economics**. Harvard University Press: Cambridge, 1979, p. 778-832.
- Hink W.F., Romstedt K.J., Burke J.W., Doskotch R.W., Feller D.R.- Inhibition of human platelet aggregation and secretion by ant venom and a compound isolated from venom. **Inflammation** **13**:175-184, 1989.
- Hirai Y., Yasuhara T., Yoshida H., Nakajima T., Fujino M., Kitada C. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. **Chem. Pharm. Bull.** **27**: 1942-1944, 1979.
- Ho C.L. & Hwang L.L. - Local edema induced by the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom and its components. **Toxicon** **29**: 1033-1042, 1991.
- Ho C.L., Hwang L.L., Chen C.T.- Edema-inducing activity of a lethal protein with phospholipase A₁ activity isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon** **31**: 605-613, 1993.

- Ho C.L., Hwang L.L., Lin Y.L., Chen C.T., Yu H.M., Wang K.T.- Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requirements. **Eur. J. Pharmacol.** **259**: 259-264, 1994.
- Ho C.L. & Ko J.L.- Hornetin: the lethal protein of the hornet (*Vespa flavitarsus*) venom. **FEBS Lett.** **209**:18-22, 1986.
- Ho C.L. & Ko J.L.- Purification and characterization of a lethal protein with phospholipase A₁ activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom. **Biochim. Biophys. Acta** **963**: 414-422, 1988.
- Ho C.L., Lin Y.L., Chen W.C., Hwang L.L., Yu H.M., Wang K.T. - Structural requirements for the edema-inducing and hemolytic activities of mastoparan B isolated from the hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon** **34**: 1027-1035, 1996.
- Hoffman DR. - Allergens in Hymenoptera venom. XIII: Isolation and purification of protein components from three species of vespid venoms. **J. Allergy Clin. Immunol.** **75**: 599-605, 1985a.
- Hoffman DR. - Allergens in Hymenoptera venom. XV: the immunological basis of vespid venom cross-reactivity. **J. Allergy Clin. Immunol** **75**: 611-13, 1985b.
- Hori S., Kawai N., Niwa A, Ohatani S. - Separation of neurotoxins from hornet (*Vespa insularis*) venom and their action on crustacean neuromuscular transmission. **J. Neurochem.** **28**: 1183-1188, 1977.

- Ishay J., Abraham Z., Grunfeld Y., Gitter S. - Catecholamines in social wasps. **Comp. Biochem. Physiol.** **48 A**: 369-373, 1974.
- Jaques R. - The hyaluronidase content of animal venoms. In: **Venoms**. (Buckley EE, Porges N, ed.). Am. Assoc. Adv. Sci. Washington, 1956, p.291-298.
- Jaques R., Schachter M.- The presence of histamine, 5-hydroxytryptamine and a potent, slow contracting substance in wasp venom. **Br. J. Pharmacol.** **9**: 53-57, 1954.
- Javors M.A, Zhou W., Maas J.W., Han S., Keenan R.W.- Effects of fire ant venom alkaloids on platelet and neutrophil function. **Life Sci.** **53**: 1105-1112, 1993.
- Jeanne R.L. - Evidence for an alarm substance in *Polistes canadensis*. **Experientia** **38**: 329-330, 1982.
- Johnson A.R. & Erdös E.G.- Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **142**: 1252-1256, 1973.
- Jones P.M., Mann F.M., Persaud S.J., Wheeler-Jones C.P. - Mastoparan stimulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by effects at a late stage in the secretory pathway. **Mol. Cell. Endocrinol.** **94**: 97-103, 1993.
- Joshua H. & Ishay J.- The hemolytic properties of the Oriental hornet venom. **Acta Pharmacol.** **33**: 42-52, 1973.
- Joshua H. & Ishay J.- The anti-coagulant properties of an extract from the venom sac of the Oriental hornet. **Toxicon** **13**: 11-20, 1975.

- Joshua H. & Ishay J.- Factors affecting the hemolytic activity of the Oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom and venom sac extract. **Toxicon** 15: 247-250, 1977.
- Joshua H., Ishay J., Gitter S., Edery H.- Hemolytic activity of *Vespa orientalis* venom. **Israel J. Med. Sci.** 7: 703-708, 1971.
- Kanwar K.C. & Sethi R.C.- Sudanophilic and PAS-positive granules in the venom gland of *Vespa orientalis*. **Toxicon** 9: 179-182, 1971.
- Kanwar K.C. & Kanwar U. - Fine structure of the venom gland of *Vespa orientalis*. **Toxicon** 13: 102-103, 1975.
- Kaplinsky E., Ishay J., Gitter S. - Oriental hornet venom: effects on cardiovascular dynamics. **Toxicon** 12: 69-73, 1974.
- Kawai N., Abe T., Niwa A. The action of a neurotoxin (mandaratoxin) in hornet venom on insect neuromuscular junction. **Neurosci. Lett.** 6 (suppl.), S69, 876-884, 1981.
- King T.P., Kochoumian L., Joslyn A.- Wasp venom proteins: phospholipase A_I and phospholipase B. **Arch. Biochem. Biophys.** 230: 1-12, 1984.
- King T.P., Sobotka A.K., Alagon A., Kochoumian L., Lichtenstein L.M.- Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms. **Am. Chem. Soc.** 17: 5165-5174, 1978.

- Komatsu M., McDermott A.M., Gillison S.L., Sharp G.W.- Mastoparan stimulates exocytosis at a Ca^{2+} independent late site in stimulus-secretion coupling. Studies with the RINm5F beta-cell line. **J. Biol. Chem.** **268**: 23297-23306, 1993.
- Kornberg A., Kaufman S., Silver L., Ishay J.- Effect of venom sac extract of the Oriental hornet (*Vespa orientalis*) on coagulation factors. **Toxicon** **12**: 1169-1176, 1988.
- Mau S.E., Witt M.R., Vilhardt H. - Mastoparan, a wasp venom peptide, stimulates release of prolactin from cultured rat anterior pituitary cells. **J. Endocrinol.** **142**: 9-18, 1994.
- Michener C.D. Family-group among bees. **J. Kansas. Entomol. Soc.** **59**: 219-234, 1986.
- Munjal D. & Elliot W.B.- Further studies on the properties of phospholipase A from honeybee (*Apis mellifera*) venom. **Toxicon** **10**: 367-375, 1972.
- Nakajima T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: **Insect and Arthropod Venoms**. Vol 4. Handbook of Natural Toxins. (Tu AT, ed.). Marcel Dekker:New York. 1984, p. 110-133.
- Nakajima T.- Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: **Venoms of Hymenoptera. Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects**. (Piek T., ed.). Academic Press: London. 1986, p. 309-327.
- Nakajima T., Yasuhara T., Uzu S., Wakamatsu T., Fukuda K., Tsukamoto Y.- Wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Peptides** **6**: 425-430, 1985.

- Neuman M.G., Ishay J.S., Waron M., Zimmerman H.J., Eshchar J.- Hepatotoxicity induced by the Oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom sac extract. **Pharmacol. Toxicol.** **69**: 1-36, 1991.
- O'Connor R. & Peck M.L. - Venoms of Apidae. In: **Arthropod Venoms**. Vol 48. Handbook of Experimental Pharmacology. (Bettini, S. ed.). Springer Verlag: Berlin. 1978, p:613-659.
- Oliveira M.R. & Palma M.S.- Polybitoxins: a group of phospholipases A₂ from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). **Toxicon** **36**: 189-199, 1998.
- Owen MD. - Insect venoms: identification of dopamine and noradrenaline in wasp and bee stings. **Experientia** **27**: 544-545, 1971.
- Owen M.D. & Bridges A.R.- Catecholamines in honeybee (*Apis mellifera* L.) and various vespids (Hymenoptera) venoms. **Toxicon** **20**: 1075-1084, 1982.
- Ozaki Y., Matsumoto Y., Yatomi Y., Higashihara M., Kariya T., Kume S. Mastoparan, a wasp venom, activates platelets via pertussis toxin sensitive GTP-binding proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **170**: 779-85, 1990.
- Perianin A. & Snyderman R.- Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol triphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.** **143**: 1669-1673, 1989.

- Piek T. - Pharmacology of Hymenoptera venoms. In: **Insect and Arthropod Venoms**. Vol.4. Handbook of Natural Toxins (Tu AT, ed.). Marcel Dekker:New York. 1984, p.135-186.
- Piek T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. **Toxicon** **29**: 139-149, 1991.
- Piek T., Hue B., Le Corrionc H., Mantel P., Gobbo M., Rocchi R. Presynaptic block of transmission in the insect CNS by mono- and di-galactosyl analogues of vespakinin 1, a wasp (*Paravespula maculifrons*) venom neurotoxin. **Comp. Biochem. Physiol. C** **105**: 189-196, 1993.
- Piek T., Hue B., Mony L., Nakagima T., Pelhate M., Yasuhara T.- Block of synaptic transmission in insect CNS by toxins from the venom of the wasp *Megascolia flavifrons* (Fab.). **Comp. Biochem. Physiol.** **87C**: 283-286, 1987.
- Pisano J.J. Kinins of non-mammalian origins. **Hand. Exp. Pharmacol.** **25**: 589-596, 1970.
- Prado J.L., Tamura Z., Furano E., Pisano J.J., Udenfriend S. - Characterization of kinins in wasp venom. In: **Hypotensive Peptides** (Erdös EG, ed.). Springer Verlag: New York. 1966, p. 93-104.
- Reisman R.E., Litter S.J., Wypych J.I.- Comparison of the biochemical, immunologic and allergic properties of vespid venoms collected in early and late summer. **Toxicon** **22**: 148-153, 1984.

- Reisman R.E., Wypych J.I., Mueller U.R., Grant J.A.- Comparison of the allergenicity and antigenicity of *Polistes* venom and other vespid venoms. **J. Allergy Clin. Immunol.** **70**: 281-287, 1982.
- Richards O.W. -**The Social Wasps of the Americas**. British Museum (Natural History): London, 1978, p. 98-154.
- Rodrigues V.M.- Estudo sobre vespas sociais do Brasil (Hymenoptera, Vespidae). Rio Claro, SP, 1968. [Tese de doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro].
- Rodrigues, V.M.- Vespídeos sociais: a reabsorção de ovócitos e a estrutura social de *Polistes (Aphanipterus) versicolor* (Olivier) (Polistinae, Polistini). **Dusenía** **13**: 123-126, 1982.
- Rosenberg P., Ishay J., Gitter S.- Phospholipase A and B activities of the Oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom and venom apparatus. **Toxicon** **15**: 141-156, 1977.
- Roubic D.W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. (Ashton P, ed.). Cambridge: Cambridge University press, 1989, p.391-420.
- Rubin Y., Duvdevani P., Ishay J. Cardiovascular haemodynamics of Oriental hornet venom sac extract. **Toxicon** **72**: 268-272, 1993.
- Schachter M., & Thain E.M.- Chemical and pharmacological properties of the potent, slow contracting substance (kinin) in wasp venom. **Br. J. Pharmacol.** **9**: 352-359, 1954.
- Schmidt J.O. Biochemistry of insect venoms. **Annu. Rev. Entomol.** **27**: 339-368, 1982.

- Schmidt J.O., Blum M.S., Overal W.L.- Comparative lethality of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon** **18**: 469-474, 1980.
- Schmidt J.O, Blum M.S, Overal W.L.- Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon** **24**: 907-921, 1986.
- Slor H., Ring B., Ishay J. - Nucleases of Oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom sac extract. 1. Acid, neutral and alkaline deoxyribonucleases and their pharmacological effects on cat blood *in vivo*. **Toxicon** **14**: 427-433, 1976.
- Storer T.I. - **Zoologia Geral**. 6^a ed. McGraw-Hill:New York, 1991, p.997.
- Wilson E.O.- **The Insect Societies**. Harvard University Press: Cambridge, 1971, p.456-468
- Wheeler-Jones C.P.D., Saermark T., Kakkar V., Authi K.- Mastoparan promotes exocytosis and increases intracellular cyclic AMP in human platelets: evidence for the existence of a G-like mechanism of secretion. **Biochem. J.** **281**: 465-472, 1992.
- Wood C.L., Hoffman D.R.- Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Hymenoptera venom and venom sac extracts. **Toxicon** **21**: 291-299, 1983.
- Yasuhara T., Mantel P., Nakagima T. Piek T. - Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp *Mesgacolia flavifrons*. **Toxicon** **25**: 257-535, 1987.
- Young A.M.- Natural history notes on the social paper wasp *Polistes erythrocephalus latreille* (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) in Costa Rica. **J. Kansas Entomol. Soc.** **59**: 712-722, 1986.