

JACQUELINE COIMBRA GONÇALVES

Identificação e efeitos antinociceptivos de um mastoparano  
isolado da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*.

BRASÍLIA, 2013

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós - graduação em Ciências da Saúde

Jacqueline Coimbra Gonçalves

Identificação e efeitos antinociceptivos de um mastoparano isolado da peçonha da  
vespa social *Parachartergus fraternus*.

Dissertação de Mestrado submetida  
ao curso de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde da Faculdade de  
Saúde da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para  
obtenção do título de mestre em  
Ciências da Saúde.

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

Brasília, DF

2013

Jacqueline Coimbra Gonçalves

Identificação e efeitos antinociceptivos de um mastoparano isolado da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*.

Dissertação de Mestrado submetida ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2013

Banca Examinadora

Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

Universidade de Brasília – UnB

Rodrigo Neves Romcy Pereira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Karla Graziella Moreira

Universidade Federal de Goiás – UFG

Aos meus pais, Lauro e Vera, meus primeiros professores.

Ao meu irmão, Leonardo, por ser meu companheiro.

Ao meu namorado, Fabiano, pela paciência e compreensão.

“Tenha cuidado com as palavras que fala, pois, se você for arrogante, fará muitos inimigos. Nunca se esqueça do antigo ditado que diz: um vento forte pode destruir uma árvore robusta, mas o salgueiro verga-se, e o vento passa sobre ele.”

Gichin Funakoshi

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, obrigada por atender aos meus pedidos e por não atende-los também me direcionando sempre.

À minha Família, essencial e especial sempre, muito obrigada Mãe, Pai (o sempre gerente de projetos) e Leo, o apoio e a aprovação de vocês me fazem seguir e me sustentam. Amo muito vocês!!

Ao meu namorado Fabiano, pelos muitos momentos de alegria, pela compreensão, por me motivar e incentivar a ser melhor. Obrigada por acreditar em mim e nos meus sonhos e nunca me deixar desistir. Te amo muito!!

Aos meus amigos Gordos, Gigi, Silvinha, Mateus, Arqueline, Antonio, Renato e Lu, obrigada pelos vários finais de semana de comilança e diversão. Amo vocês!

À minha querida Professora e Orientadora Márcia, obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos, sempre com muita alegria e paixão.

Aos Professores do LTx, Carlos, Elisabeth e Osmino pelos ensinamentos, companhia e amizade.

Aos amigos do laboratório e da UnB, Karla, Lilian, Priscilla, Juliana, Andréia, Bruna, Rafael, Romulo, Flávia, Fred, Maíra, Carol, Harry, Claudia, Carol, Talita, Fagner, pelo apoio, auxílio, companhia e diversão.

Ao Prof. Dr. Fernando Noll, por gentilmente identificar as vespas.

Ao Prof. Dr. Luciano Paulino, por abrir as portas do seu laboratório e por ser muito paciente ao me ensinar e ajudar na Espectrometria de massa.

Ao DPP-UnB, à CAPES, ao CnPq e à FAPDF pelo apoio financeiro

Ao PPGCS, pela oportunidade.

## RESUMO

A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial, ou descrita em termos desse dano potencial” e tem sido elencada como um grave problema de saúde pública. A terapia analgésica atual baseia-se no manejo sequencial de analgésicos, o qual tem como último recurso o uso de opióides como a morfina que é extremamente eficaz, porém produzem efeitos colaterais sistêmicos, além de desenvolverem dependência e tolerância. Atualmente, a busca por novos fármacos com alvos alternativos tem sido necessária a fim de minimizar os efeitos colaterais ou aumentar a eficácia do tratamento para a dor. As vespas, artrópodes da ordem *Hymenoptera*, possuem em suas peçonhas uma quantidade enorme de toxinas bioativas que podem atuar como antimicrobianas, anticonvulsivantes, ansiolíticas e antinociceptivas. O mastoparano é uma classe de peptídeos muito abundante na peçonha de vespas que tem demonstrado um enorme potencial para novas drogas antimicrobianas e excelentes ferramentas para o estudo de proteínas G. O objetivo deste trabalho foi descrever a atividade antinociceptiva de um mastoparano isolado da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*, uma atividade inédita para esse grupo. Para tanto, a peçonha foi filtrada e cromatografada para a separação dos seus compostos. As frações selecionadas foram testadas, aquela que apresentou atividade antinociceptiva (PFTx 10) foi encaminhada a espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) para caracterização de sua massa molecular e sequenciamento. Após as análises, descobriu-se que se tratava de um mastoparano de massa 1566,99 Da de sequência idêntica ao peptídeo AGELAIA – MP I. O peptídeo foi então sintetizado e posteriormente, testado em três doses distintas – 3.2, 4.8 e 6.4 mM. A maior dose apresentou efeito antinociceptivo máximo por até quatro horas, sendo observado decréscimo do índice de antinocicepção após 24 horas, e três dias após o efeito ainda se apresentava maior que o da salina. Os resultados obtidos revelam o grande potencial no estudo de novos compostos isolados da peçonha de vespas com atividade no Sistema Nervoso Central. Além disso, diversos compostos descritos ainda tem funções farmacológicas desconhecidas, que podem proporcionar o desenvolvimento de ferramentas para o estudo do funcionamento cerebral normal ou patológico.

## ABSTRACT

Pain is defined by the International Association for the Study of Pain (IASP) as "an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential damage, or described in terms of such damage potential" and has been classified as a serious health problem public. Nowadays the analgesic therapy is based on the sequential handling of pain killers, which has as a last resort opioids like morphine which is very effective but produces systemic side effects, in addition to develop dependence and tolerance. Therefore, the search for new drugs with alternative targets becomes necessary in order to minimize side effects or enhance efficacy of treatment. Wasps, arthropods of the order Hymenoptera, have a great amount of bioactive toxins in their venom that can act as antimicrobial, anticonvulsant, anxiolytic and antinociceptive. The mastoparan is an abundant class of peptides in the venom of wasps which has shown potential for new antimicrobial drugs and excellent tools for the study of protein G. The goal of the present study is to describe the antinociceptive activity of a mastoparan isolated from the venom of the social wasp *Parachartergus fraternus*, a novel activity for this class of peptides. For this purpose, the venom was filtered and chromatographed to separate the compounds. The selected fractions were tested, one that showed antinociceptive activity (PfTx 10) was referred to mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) to characterize its molecular weight and sequencing. After analysis, it was identified as a mastoparano with mass of 1566.99 Da and peptidic sequence identical to Agelaia - MP I. The peptide was subsequently synthesized and then tested in three different concentrations - 3.2, 4.8 and 6.4 mM. The largest dose reported maximum antinociceptive effect for up to four hours and also reduced the rate of antinociception after 24 hours and three days after i.c.v. injection the effect is still showed greater than that of saline. The results revealed the great potential of the study of compounds isolated from the venom of wasps with activity in the central nervous system. In addition, various compounds described still have unknown pharmacological functions that can provide the development of tools for the study of normal or pathological brain function.

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Ilustração representando as vias modulatórias para a dor. Em vermelho está indicando a via ascendente e em verde a via descendente. DRT (núcleo reticular dorsal); RMV (medula rostroventral); LC (Locus Coeruleus); PAG (região periaquedutal cinza) (Ossipov et al, 2010). ..... 16
- Figura 2:** Estereotaxia para implantação da cânula guia, a direita, no ventrículo lateral e o parafuso balanceador e fixador do capacete posicionado no lado contralateral. .... 40
- Figura 3:** Etograma de comportamentos de nocicepção apresentados pelo animal no teste da placa quente (modificado de Casarrubea et al., 2011). ..... 41
- Figura 4:** Analgesímetro digital Insight® utilizado para a realização do teste de retirada de cauda. .... 43
- Figura 5:** Colônia de *Parachartergus fraternus* localizada no estacionamento do Instituto Central de Ciências Ala Sul (ICC-Sul) da Universidade de Brasília (UnB) a aproximadamente 3,5 metros do chão. .... 44
- Figura 6:** Exemplar de *Parachartergus fraternus*. Foto com lupa no aumento 6x. .... 45
- Figura 7:** Perfil cromatográfico dos compostos de baixa massa molecular (até 3000 Da) da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18 ODS, 15µm, 250 x 10 mm), eluição com ACN e TFA por um gradiente isocrático de 5% ACN + TFA 0,1% (20 min), por gradiente linear de 5% até 60% de ACN + TFA 0,1% por 40 min, com um fluxo de 1,5 mL/min. As frações eluídas foram monitoradas a 216 nm. O gradiente de acetoneitrila está demonstrado pela linha azul. Em cada cromatografia foram injetadas 4mg de peçonha. .... 46
- Figura 8:** Teste de screening (tail-flick) das frações cromatográficas de *Parachartergus fraternus* injetadas via i.c.v. em camundongos. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-way ANOVA seguido do Bonferroni. \* em relação à salina, + em relação à PfTx 3. \*\* p<0.001, \*\*\* p<0.0001. .... 47
- Figura 9:** Espectro de massa da fração PfTx 2, obtido por MALDI/TOF no modo linear refletido. .... 49
- Figura 10:** Espectro de massa da fração PfTx 3, observa-se compostos com intensidades distintas. O mais intenso é aquele de massa monoisotópica de 1055.61 Da, provavelmente referente a bradicinina. Aquisição por MALDI/TOF no modo linear refletido. .... 50
- Figura 11:** Espectro de massa da fração PfTx 4, sendo visível o peptídeo majoritário

[M+H] <sup>+</sup> = 1358.780. A aquisição do espectro foi realizada pela técnica do MALDI/TOF no modo linear refletido.....	51
<b>Figura 12:</b> Espectro de massa da fração PfTx 6, pode-se observar um pico majoritário muito intenso com massa monoisotópica de [M+H] <sup>+</sup> = 2748.501. O espectro foi obtido por MALDI/TOF no modo linear refletido. ....	52
<b>Figura 13:</b> Espectro de massa da fração PfTx 10, obtido por MALDI/TOF no modo linear refletido, mostrando as formas protonadas do peptídeo, com hidrogênio e seus aductos com sódio e potássio respectivamente. ....	53
<b>Figura 14:</b> Sequenciamento de novo do peptídeo majoritário da fração PfTx 10. Realizado no MALDI-TOF/TOF no método LIFT. ....	55
<b>Figura 15:</b> Sequências de mastoparanos isolados de vespas sociais alinhadas pela ferramenta de múltiplos alinhamentos Clustal W disponível no softwareBioedit v.7.0.4.1.....	56
<b>Figura 16:</b> Espectro de massa MALDI – MS do peptídeo sintetizado idêntico ao natural pela empresa AminoTech®, demonstrando a pureza do peptídeo [M + H] <sup>+</sup> = 1566,99 m/z. A presença de mais de uma massa se deve ao fato de possuir um aducto com sódio e um com potássio.....	58
<b>Figura 17:</b> Espectro MS/MS do peptídeo sintetizado pela AminoTech® idêntico ao natural, comprovando a sequência. ....	59
<b>Figura 18:</b> Índice de antinocicepção das latências de escape da placa quente após injeção i.c.v. do Mastoparano sintético em camundongos. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni. * Diferenças significativas em relação à salina.*** = p<0.001; ** = p<0.01; * = p<0.05. # Diferenças significativas em relação a morfina. + Diferenças significativas em relação a dose 3.2 mM. § Diferenças significativas em relação a dose 4.8 mM.....	60
<b>Figura 19:</b> Área abaixo da curva do Índice de antinocicepção da placa quente (hot-plate). Os dados foram submetidos ao teste estatístico Anova seguido pelo teste de Tukey. * Diferenças significativas em relação à salina.*** = p<0.001; ** = p<0.01; * = p<0.05. # Diferenças significativas em relação a morfina. + Diferenças significativas em relação a dose 3.2 mM. § Diferenças significativas em relação a dose 4.8 mM.....	61
<b>Figura 20:</b> DE50 do Mastoparano sintético testado via i.c.v. em camundongos (IC 95%= 6.29 a 8.83).....	62
<b>Figura 21:</b> Índice de antinocicepção do teste de retirada da cauda. após a administração do mastoparano via i.c.v. Os dados foram submetidos ao teste	

Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni. \* Diferenças significativas em relação à salina.\*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação a dose 6.4. + Diferenças significativas em relação a dose 3.2 mM. § Diferenças significativas em relação a dose 4.8 mM. ....63

**Figura 22:** Área abaixo da curva do teste de retirada da cauda. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Anova seguido pelo teste de Tukey. \* Diferenças significativas em relação à salina.\*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação a morfina. ....64

**Figura 23:** Na Figura 22a está indicado em vermelho a posição da cânula guia no ventrículo lateral esquerdo segundo o atlas de Franklin & Paxinos (1997), e em b a marcação em azul de uma fatia do encéfalo do animal utilizado no experimento, a seta vermelha indica a inserção da cânula. ....65

**Figura 24:** Árvore filogenética da Família Polistinae (Wenzel e Carpenter, 1994)....67

**Figura 25:** Estrutura secundária tridimensional do mastoparano isolado da peçonha da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* denominado Agelaia-MP I (Baptista-Saidemberg et al, 2012). ....69

**Figura 26:** Representação do mastoparano na membrana citoplasmática mimetizando um receptor metabotrópico (Jone e Howl, 2006 modificado). ....71

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Sequências primárias e massas moleculares de cininas isoladas de vespas.....	27
<b>Tabela 2:</b> Sequência primária das massas moleculares de mastoparanos isolados de vespas sociais e solitárias.....	30
<b>Tabela 3:</b> Quantificação das frações testadas por peso seco.....	47
<b>Tabela 4:</b> Análise das massas moleculares majoritárias da peçonha de <i>Paracharergus fraternus</i> .....	54

## Lista de abreviaturas

AINE – Antiinflamatório Não Esteroidal

ASIC – *Acid-sensitive Ion Channel*

AUC – *Area Under Curve*

AvTx 8 – *Agelaia vicina* Toxina 8

BK – Bradicinina

BmK – *Buthus martensii* Karsh

CBMM – Compostos de Baixa Massa Molecular

CENARGEN – Embrapa Recursos Genéticos e Tecnologia

CEUA – Comitê de Ética em Uso Animal

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONCEA – Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

COX – Ciclo-oxigenase

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FDA – *Food and Drug Administration*

GABA – Ácido Gama-aminobutírico

IA – Índice de Antinocicepção

IASP – *International Association for the Study of Pain*

IB – Instituto de Biologia

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

JCAHO – Joint Commission on Accreditation on Healthcare Organizations

MALDI-TOF/TOF – *Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of Flight*

MP – Mastoparano

MS - *Mass spectrometry* Espectros de massa

NMDA – N-metil-D-aspartato

PAG – Substancia Cinzenta Periaquedutal

PfTx – *Parachartergus fraternus* Toxinas

PTZ – Pentilinetatrazol

RVM – Medula Rostroventral

SBED – Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

SNC – Sistema Nervoso Central

TENS – Eletro Estimulação Transcutânea

TFA – Ácido Trifluoroacético

Thr-6-BK – Treonina-6-Bradiginina

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Ves-CP – Peptídeos Quimiotáticos de Vespas

## Sumário

1	Introdução .....	11
1.1	Dor e Nocicepção.....	11
1.2	Mecanismos neurais da nocicepção .....	14
1.3	Analgésicos e terapias para dor.....	17
1.4	Toxinas analgésicas de artrópodes .....	22
1.5	Peptídeos de vespa com atividade biológica .....	24
1.5.1	Cininas.....	25
1.5.2	Mastoparanos .....	28
1.5.3	Quimiotáticos .....	30
1.5.4	Neuroativos .....	32
1.6	A vespa <i>Parachartergus fraternus</i> .....	33
2	Objetivos .....	35
2.1	Geral .....	35
2.2	Específicos.....	35
3	Material e Métodos.....	36
3.1	Coleta.....	36
3.2	Preparação da peçonha .....	36
3.3	Separação dos componentes.....	37
3.4	Identificação da massa molecular e sequenciamento .....	37
3.5	Alinhamento .....	38
3.6	Bioensaios.....	38
3.6.1	Animais.....	38
3.6.2	Procedimento experimental .....	39
3.7	Testes experimentais.....	40
3.7.1	Teste da placa quente ( <i>hot plate</i> ).....	40
3.7.2	Teste da retirada de cauda ( <i>tail-flick</i> ) .....	42
3.8	Análise histológica.....	43
3.9	Análises estatísticas.....	43
4	Resultados .....	44
4.1	Coleta e Extração da peçonha .....	44
4.2	Separação dos componentes da peçonha .....	45
4.3	Bioensaios com frações .....	46
4.4	Espectrometria de massa.....	48
4.5	Sequenciamento do peptídeo majoritário da PfTx 10 .....	54
4.6	Análise da sequência primária .....	56
4.7	Peptídeo Sintético .....	56

4.8	Efeito antinociceptivo do peptídeo sintético em modelos de indução de dor térmica (placa quente e retirada da cauda) em camundongos .....	60
4.9	Verificação da cânula guia .....	64
5	Discussão.....	66
6	Conclusão .....	74
7	Referências .....	75

# 1 Introdução

## 1.1 Dor e Nocicepção

As civilizações mais antigas entendiam a dor como um castigo divino, resultado de possessões demoníacas ou até mesmo como forma de obter graças divinas, e por esses motivos, vários cientistas importantes ao longo do tempo dedicaram seus estudos para entender e amenizar a dor (Lent, 2008; Chimello e Neto, 2004).

Alcmaeón (535 a.C.), um discípulo de Platão, foi o primeiro a atribuir a percepção dos sentidos e da dor ao cérebro. Aristóteles (384-322 a.C.) descrevia a dor como uma estimulação excessiva de qualquer um dos cinco sentidos encarando-a mais como uma condição emocional do que fisiológica. Ele acreditava que o coração e não o cérebro era a sede dos sentidos e da dor, e por causa da sua notoriedade essa ideia perdurou por quase 2000 anos, gerando um atraso significativo nos estudos científicos sobre esse tema (Chimello e Neto, 2004). Posteriormente, o fisiologista Galeno (130-201) estudou e classificou os nervos periféricos em três categorias de acordo com sua função em: motores, sensoriais e “especiais”, esta última foi a terminologia adotada por ele para os nervos que conduziam a informação dolorosa. René Descartes (1596-1650 d.C.), filósofo francês, apoiou as ideias de Galeno estudando a comunicação entre nervos periféricos e cérebro, introduzindo o conceito de reflexo (Lent, 2008; Coimbra, 1995).

Somente na década de 1970, foi que surgiram organizações científicas especializadas para o estudo da dor como a Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) que surgiu em 1974 e a revista *Pain*, criada em 1975 (Coimbra, 1991). Com o crescente interesse mundial pelo tema e com o estímulo da criação da IASP, o Brasil fundou a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), na década de 80 (Barros, 2005).

O Primeiro Subcomitê de Taxonomia da Dor da IASP propôs a seguinte definição "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um

dano real ou potencial, ou descrita em termos desse dano potencial". Essa é uma definição única que engloba tanto o componente sensorial-discriminativo da dor, quanto o afetivo-emocional (Lent, 2008; Oliveira *et al.*, 2008).

A dor pode ser classificada de duas maneiras. A primeira é caracterizada de acordo com o seu tempo de duração, divide a dor em aguda, sentida em um curto intervalo de tempo enquanto o estímulo persistir, ou crônica, sentida por um longo período mesmo após o desaparecimento do estímulo (IASP, 1994). Embora seja muito relativo o conceito de longo ou curto período, parece haver uma concordância entre a comunidade acadêmica que considera a dor crônica aquela que persiste por no mínimo três meses (Sidal e Loeser, 2001; Cohen *et al.*, 2013).

A outra classificação da dor refere-se ao estímulo direto dos nociceptores podendo ou não haver injúria tecidual, dividida em: nociceptiva, neuropática, central e alodínia. A dor nociceptiva é aquela que deriva da ativação direta dos nociceptores, neste caso, quando há uma lesão tecidual ocorre liberação de substâncias no local do dano estimulando os nociceptores a realizarem a transdução de sinal gerando um impulso nervoso para a sensação dolorosa. A dor neuropática caracteriza-se por disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos, enquanto a dor central é causada por danos ou disfunções no Sistema Nervoso Central. E finalmente, a alodínia é uma dor causada por um estímulo sensorial inócuo, normalmente de origem inflamatória persistente, ou em casos de cicatrização de lesões grandes como nos pós-operatórios (IASP, 1994).

De extrema importância para o organismo, a dor é um indicador da integridade corporal e tem sido considerada desde janeiro de 2000 pela *Joint Commission on Accreditation on Healthcare Organizations* (JCAHO) o quinto sinal vital, devendo ser avaliada e registrada em conjunto com os outros sinais. O sistema nociceptivo está formado entre a 24ª e a 28ª semana de gestação, ou seja, neonatos a termo e pré-termo podem sentir dor, sendo esta sensação neles mais desagradável e duradoura, pois os sistemas de inibição e modulação da nocicepção ainda não estão completamente formados (Linhares e Martinez, 2005). Na fase de crescimento, na primeira infância e na adolescência, a dor do crescimento é uma queixa bastante comum afetando cerca 37% das crianças (Forni e Jalikhian, 2012). Em adultos, aproximadamente 20% da população mundial sofre com dor crônica

(Park e Moon, 2010), sendo considerada uma questão de saúde pública, pois esta é uma condição incapacitante para muitos trabalhadores (Kreling *et al*, 2006). Em idosos, a prevalência de dor crônica é maior que em adultos, sendo a queixa principal nos ambulatórios (Silveira *et al*, 2012).

É importante salientar também que a dor não tratada pode se perpetuar, e causar imunossupressão suscetibilizando o paciente a outras doenças, onde a dor também se apresenta como um sintoma criando um círculo vicioso (Stucky *et al.*, 2001). Para estes pacientes e para portadores de dores neuropáticas, são necessários tratamentos mais agressivos, com o uso de opiáceos, onde apenas 30% a 50% apresentam melhora clínica. Outro fator importante é que mesmo os pacientes que apresentam respostas positivas ao tratamento, estão sujeitos aos efeitos adversos sistêmicos indesejados dos fármacos e ao desenvolvimento de tolerância e dependência, fatores que limitam o uso clínico do fármaco (Rajendra *et al*, 2004).

Estudos epidemiológicos da incidência da dor são escassos no mundo e principalmente, no Brasil. Em 2000, um amplo estudo realizado nos Estados Unidos revelou que aproximadamente 86 milhões de norte-americanos apresentavam dores crônicas, destes, 65 milhões (75%) encontravam-se incapacitados total ou parcialmente, representando um gasto anual do governo de cerca de 70 bilhões de dólares (Marquez, 2004). No Brasil, dados recentes do Hospital Universitário da Universidade Federal do Triângulo Mineiro demonstraram que 49,5% dos pacientes do Pronto Socorro apresentaram a dor como queixa principal a sua visita, e mesmo após tratados, alguns pacientes obtiveram alta com níveis intermediários de dor, ressaltando o fato que a dor deve ser melhor valorizada e tratada (Barreto *et al*, 2012). De maneira similar, em hospitais da região Sul do Brasil, foi verificado que cerca de 40% dos pacientes apresentavam como queixa principal a dor (Dal Ponte *et al*, 2008). Vale ressaltar, que a queixa de dor deve ser sempre valorizada e respeitada, principalmente devido ao desconforto que manifesta (Pedroso e Celich, 2006).

Atualmente, para o estudo desse fenômeno deve-se diferenciar a dor de nocicepção. Segundo a IASP (1994), dor é a captação do estímulo somado ao componente emocional momentâneo que o paciente apresenta na hora da lesão,

enquanto a nocicepção se refere a captação do estímulo pelos nociceptores que gera um potencial de ação no neurônio aferente e a respectiva transmissão deste estímulo até centros superiores no cérebro.

Em testes com animais de experimentação, devido à dificuldade de avaliar os componentes subjetivos da dor, é avaliada a nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais em testes de experimentação (Jones, 1992).

## **1.2 Mecanismos neurais da nocicepção**

O termo nocicepção, derivado do latim *nocere* que significa "ferir ou prejudicar", é o nome dado ao processo pelo qual os organismos detectam estímulos potencialmente ou realmente prejudiciais. A base deste sistema é uma classe específica de neurônios aferentes sensoriais chamados de nociceptores, definida pela IASP como "um receptor, preferencialmente, sensível a um estímulo nocivo, ou a um estímulo que se torne nocivo, se prolongado" (Smith e Lewin, 2009).

As terminações nervosas livres das fibras aferentes, que transmitem informações de regiões periféricas para o Sistema Nervoso Central (SNC), contêm os nociceptores, receptores que quando ativados, na presença de um estímulo potencialmente perigoso, são capazes de gerar um potencial de ação e conseqüentemente a sensação dolorosa. Esses nociceptores estão presentes nos mais variados tecidos do corpo humano como pele, vasos, músculos, articulações e vísceras, exceto no encéfalo, único órgão desprovido de nociceptores (para revisão ver Lent, 2008).

Apenas estímulos de determinada intensidade têm a capacidade de ativar os receptores nociceptivos, esses estímulos são chamados de nóxios que, semelhante a outros sistemas sensoriais como visão e olfato, ativam o receptor quando são mais fortes que seu limiar (Lent, 2008).

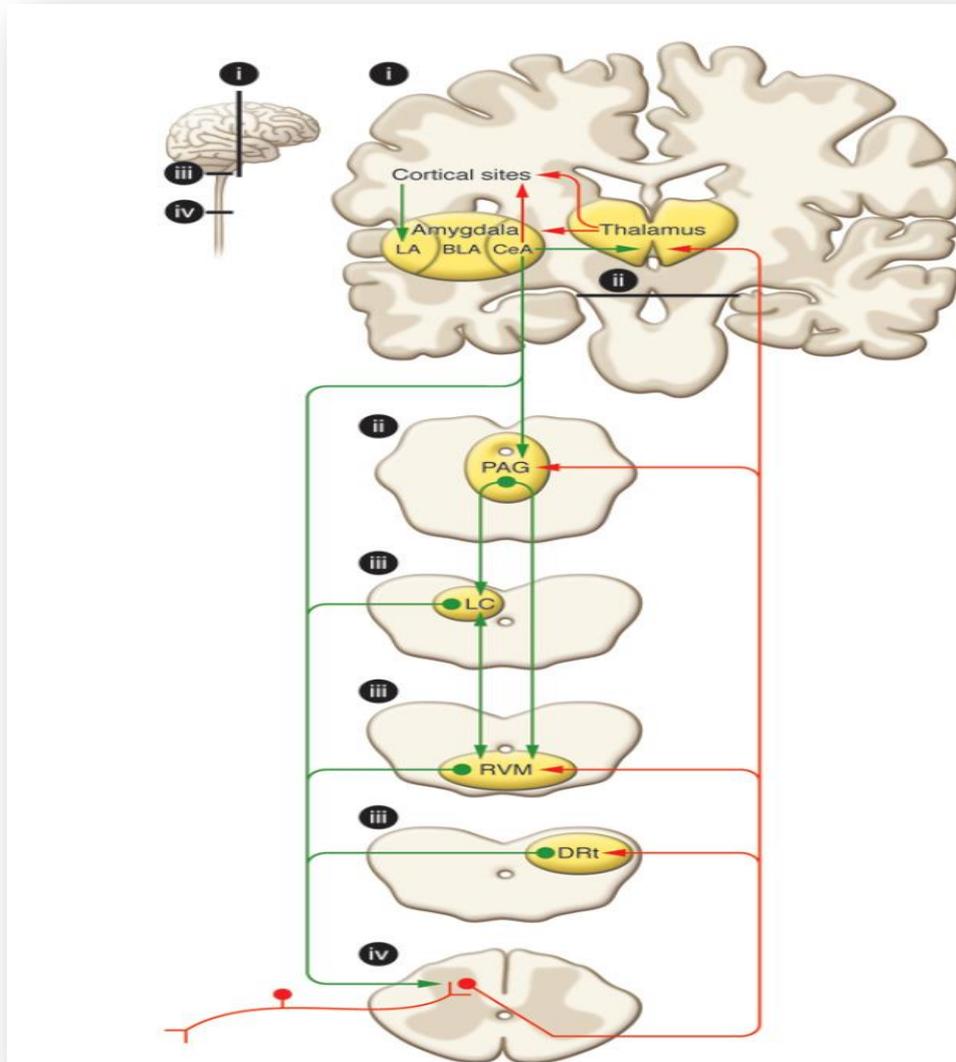
Os nociceptores são capazes de perceber estímulos de natureza física (mecânicos e térmicos) e química, substâncias liberadas no local da lesão devido ao dano tecidual. De acordo com o estímulo captado pelos nociceptores, eles podem ser classificados em: mecanoreceptores, sensíveis a pressão intensa; termoreceptores, sensíveis a estímulos térmicos acima de 45°C e nociceptores polimodais, sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (para revisão ver Julius e Basbaum, 2001; Oliveira *et al.*, 2008).

As fibras A $\delta$  e C conduzem os estímulos dolorosos em velocidades diferentes devido às suas características físicas. As fibras A $\delta$ , responsáveis pela transmissão da nocicepção aguda e rápida, são mielinizadas, com diâmetro médio de 2-6  $\mu$ m e velocidade de condução que varia de 12 a 30 m/s. Enquanto as fibras C conduzem a informação para o SNC de forma lenta por serem amielínicas e, por isso, seu diâmetro é pequeno, variando de 0,4-1,2  $\mu$ m e sua velocidade de condução de 0,5 a 2 m/s. Os corpos celulares dos nociceptores estão localizados nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal (Julius e Basbaum, 2001).

A informação obtida pelos nociceptores é convertida em sinais eletroquímicos e transformada em potencial de ação, processo denominado transdução de sinal. A estimulação de um número suficiente de transdutores dará origem ao potencial de ação que será conduzido pelas fibras C e A $\delta$  para o encéfalo produzindo a sensação de dor, passando por neurônios de segunda ordem na medula espinhal e depois para estruturas supra espinhais (Lent, 2008).

Os estímulos dolorosos se encaminham ao SNC, a partir das vias ascendentes. Quando há um dano ou lesão tecidual ocorre a liberação de uma série de substâncias distintas denominadas genericamente de sopa algogênica (serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, glutamato) que ativam os nociceptores das fibras aferentes A $\delta$  e C, estes encaminham os estímulos ao corno dorsal da medula, liberando glutamato e substância P, concretizando uma sinapse com o neurônio de segunda ordem (Levine, 1993; Dickenson, 1995; Bennet, 2000). Após a sinapse, o neurônio cruza a medula e pode seguir por dois feixes o neoespinotalâmico e o paleoespinotalâmico, ambos se dirigem ao tálamo, onde realizam outra sinapse e se encaminham ao córtex sensorial e límbico, resultando no processamento da informação nociceptiva, com a identificação da localização

exata e da integração com o componente emocional da dor (Marquez, 2004; Hill, 2001).



**Figura 1:** Ilustração representando as vias modulatórias para a dor. Em vermelho está indicando a via ascendente e em verde a via descendente. DRt (núcleo reticular dorsal); RVM (medula rostroventral); LC (Locus Coeruleus); PAG (região periaquedutal cinza) (Adaptado de Ossipov *et al*, 2010).

Uma das formas de modulação da dor é pelas vias aferentes, a teoria da comporta, criada pelos fisiologistas ingleses Ronald Melzack e Patrick Wall em 1960, postula que a ativação de fibras táteis ( $A\beta$ ), ativa o interneurônio presente na substância gelatinosa, bloqueando ou atenuando a ativação de neurônios de

segunda ordem, de modo a impedir ou diminuir a transmissão da dor. Por esse motivo o uso da estimulação elétrica transcutânea (TENS) é adotado pelos fisioterapeutas no alívio de algumas dores (Marquez, 2004; Lent, 2008).

Além da modulação ascendente, existe uma importante modulação descendente da nocicepção, originadas no tronco cerebral e em outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas, no corno dorsal da medula espinhal (Millan, 2002; Vanegas e Schaible, 2004).

Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações, em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, inibitórios e neurônios de projeção (Millan, 2002). Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que esse pode tanto facilitar, quanto inibir a transmissão nociceptiva (Julius e Basbaum, 2001; Porreca *et al*, 2002). Na RVM estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células “liga” (on) e as células “desliga” (off), as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva. É proposto que as células “liga” (on) facilitam a condução de estímulos nociceptivos quando ativadas, e as células “desliga” (off) inibem a transmissão nociceptiva, provocada pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal (PAG). Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo nociceptivo periférico. No entanto, em situações de dor persistente, as alterações da neuroplasticidade podem resultar em uma estimulação facilitatória sustentada, o que ocasiona respostas persistentes e exageradas à dor (Porreca *et al*, 2002).

### **1.3 Analgésicos e terapias para dor**

A procura por novas drogas analgésicas pelas indústrias farmacêuticas teve um crescimento considerável nos últimos 10 anos, sendo atualmente, depois do

câncer, a segunda maior área que apresentou crescimento de pesquisas (Arrowsmith, 2012).

As terapias farmacológicas de combate a dor envolvem o uso de analgésicos, que podem ser agonistas opióides, comuns ou adjuvantes, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou antidepressivos, usado em alguns casos de dores crônicas persistentes, e podem ser administrados por via sistêmica ou diretamente no neuroeixo (Flores *et al*, 2012).

Os AINEs, como a indometacina, o ácido acetilsalicílico e o paracetamol inibem a ação das enzimas ciclo-oxigenase tipo 1 e tipo 2 (COX-1 e COX-2) reduzindo a síntese de prostaglandinas e conseqüentemente, a sensibilização de terminações nervosas nos tecidos periféricos. Indicados para o combate de dores agudas, sua utilização sistêmica pode ocasionar importantes efeitos indesejáveis hepáticos, cardiovasculares, gastrointestinais e renais, limitando sua utilização (Souza, 2008; Flores *et al*, 2012). A dipirona, mais conhecida no Brasil pelo nome de Novalgina®, é um AINE que atua ativando canais de potássio sensíveis a ATP e também é uma inibidora da COX, causando uma analgesia periférica e central respectivamente. Seu uso é proibido em grande parte do mundo por ser muito tóxica ao organismo, pois pode causar agranulocitose grave levando o paciente a óbito (Brasil, 2001; Hedenmalm e Spigset, 2002).

Nas últimas décadas, tem se optado também por fármacos com diferentes mecanismos de ação e que primeiramente foram desenvolvidos para o tratamento de outras doenças, como antidepressivos, antiepilépticos e sedativos. Os antidepressivos podem ser usados como adjuvantes na terapia analgésica em basicamente duas situações, quando não há alívio com a administração de analgésicos ou auxiliando os analgésicos convencionais, sendo muito utilizado como opção terapêutica para pacientes com dor neoplásica multilocalizada. É interessante ressaltar que os antidepressivos atuam de forma mais rápida e em doses mais baixas quando sua finalidade é o tratamento da dor, seu mecanismo de ação se deve pela inibição da captação da noradrenalina e da serotonina, aumentando a ativação da via descendente inibitória da dor (Flores *et al*, 2012; Agostinho e Camacho, 2009). Além dos antidepressivos, o diazepam e alguns anticonvulsivantes de primeira e segunda geração são exemplos muito utilizados na prática clínica para

o alívio de diversas dores, mesmo assim, ainda podem causar vários efeitos adversos como boca seca, constipação intestinal e alterações no ritmo cardíaco (Agostinho e Camacho, 2009).

Pode-se citar também a clonidina, que é originalmente um fármaco utilizado para tratar hipertensão, e um agonista dos receptores  $\alpha$ -2adrenérgicos pré-sinápticos, que estão presentes no cérebro, medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal. Utilizada por via oral ou injetável seu uso terapêutico como analgésico e sedativo é muito eficaz, porém seus efeitos colaterais, como boca seca, hipotensão e hipertensão rebote têm limitado seu uso clínico (Flores, 2012; Smania e Garcia, 2005). Outro exemplo é a cetamina que é um antagonista não competitivo dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e tem sido utilizada para impedir os mecanismos de sensibilização central e o fenômeno de *wind-up*, que ocorrem na perpetuação da dor. Atualmente, sua administração sistêmica tem sido evitada devido aos seus efeitos adversos graves como náuseas, vômitos e principalmente as alucinações (Flores, 2012).

Os medicamentos mais utilizados atualmente no tratamento de dores crônicas e persistentes são os analgésicos opióides, drogas extremamente eficazes, mas que produzem efeitos colaterais sistêmicos, além de desenvolverem dependência e tolerância nos pacientes que a utilizam com frequência, limitando seu uso clínico (Rajendra *et al.*, 2004).

O ópio, uma substância natural derivada da Papoula (*Papaver somniferum* ou *Papaver bracteatum*) vem sendo utilizado desde os tempos remotos como componentes de fármacos ou com finalidade recreativa. Seu uso mais antigo é datado de 3400 a.C. período no qual tem-se evidências do cultivo da papoula pelos Sumérios que a descreviam como “planta da alegria” (Duarte, 2005; Martins *et al.*, 2012). Como substância terapêutica o ópio foi utilizado por Hipócrates, em 460 a.C., como narcótico, sendo que os romanos foram os primeiros a reconhecerem suas propriedades analgésicas. Vários textos médicos antigos, como os descritos por Galeno e Avicena relatavam o ópio como um potente analgésico (Duarte, 2005; Martins *et al.*, 2012).

A morfina, um composto orgânico alcaloide, foi isolada do ópio no século XIX por um assistente farmacêutico alemão Friedrich Serturmer em 1803, sendo assim denominada em homenagem ao Deus grego do sono Morfeu (Duarte, 2005; Hamilton e Baskett, 2000). Outros alcaloides do ópio como a codeína e a tebaína também possuem propriedades analgésicas, mas estão presentes em proporção muito menores no ópio. Atualmente, a Austrália, a Turquia e a Índia são os maiores produtores de ópio para fins medicinais (Martins *et al*, 2012).

Após o estabelecimento das estruturas químicas dos derivados naturais do ópio, foram obtidos vários derivados semissintéticos alcançados por modificações simples nas moléculas de morfina e de tebaína, culminando no surgimento da meperidina em 1939, o primeiro opióide completamente sintético (Duarte, 2005).

O principal problema enfrentado com a utilização contínua da morfina, que tem sido usada para tratar dores de intensidade moderada a forte, é que esta droga pode causar tolerância e dependência, além de outros efeitos colaterais importantes como depressão respiratória, náuseas, vômito e constipação intestinal (Peng *et al*, 2009). Utilizada para o tratamento de dores, a morfina atua nos receptores opióides ativando o sistema endógeno supressor da dor (Duarte, 2005; Flores *et al*, 2012).

Recentemente, um grupo de toxinas descobertas de um molusco marinho tem desempenhado um papel importante no controle de dor. As toxinas de *Conus sp.* (conotoxinas), representam um grupo de pequenos oligopeptídeos que contêm um grande número de resíduos de cisteína e atuam, em sua maioria, em canais iônicos, influenciando na propagação do impulso nervoso. Seu mecanismo de ação permite estudar o funcionamento de canais iônicos, além de ser uma excelente fonte de novas drogas, pois são muito específicas e efetivas em baixas doses. Atualmente, apenas uma droga baseada nas conotoxinas encontra-se comercialmente disponível e já foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA). Seis novas drogas estão passando pelos testes clínicos e mais de 20 drogas estão nos testes pré-clínicos, sendo a maioria neuroativos, analgésicos e antiepiléticos (Fedosov *et al*, 2011).

Os principais alvos moleculares das novas drogas baseadas em conotoxinas são os canais de cálcio do tipo N presentes na medula espinhal. Tais canais são os responsáveis pela condução do estímulo doloroso ao cérebro, bloqueando-os,

bloqueia-se a sensação dolorosa. Esse é o mecanismo de ação do Ziconotide (Prialt®), aprovado pela FDA em 2004, trata-se de um peptídeo sintético baseado na estrutura da  $\omega$ -conotoxina MVIIA identificada da peçonha de *Conus magnus*, que atua na *substantia gelatinosa* da medula, região essencial para o processamento da informação nociceptiva, impedindo a liberação de substância P pelos neurônios nociceptivos primários. Um bloqueador potente de canais de cálcio voltagem dependentes do tipo N, o ziconotide possui efeitos analgésicos melhores que o da morfina, não causa tolerância e dependência, e tem sido prescrito para o tratamento de dor crônica e aguda (Fedosov *et al*, 2011; Yakash *et al*, 2012).

Alternativas não farmacológicas para o controle da dor são utilizadas a mais de dois milênios e ainda hoje, diversas técnicas têm sido estudadas e validadas para o uso no auxílio ao tratamento da dor. A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) é baseada num conjunto complexo de técnicas terapêuticas que buscam tratar o indivíduo como um todo, através da estimulação de mecanismos naturais para restaurar o equilíbrio energético do corpo e proporcionar saúde. A técnica mais utilizada desse conjunto é a acupuntura, originada na China a mais de 2000 anos, que apresenta uma série de vantagens como o baixo custo de aplicação e de recursos materiais, a ausência de efeitos colaterais significativos, e a alta resolubilidade (Pereira e Villela, 2012; Monzani *et al*, 2010).

Estudos avaliam que a acupuntura pode estimular as vias descendentes de controle da nocicepção estimulando algumas regiões por reflexo como o núcleo magno da rafe e a substância cinzenta periaquedutal, aumentando a concentração de serotonina e diminuindo a de noradrenalina, resultando na inibição da dor (Monzani *et al*, 2010).

Além disso, sabe-se que a acupuntura é eficaz para o alívio da dor neuropática periférica, acreditando-se que algumas neurotrofinas e citocinas estejam envolvidas no mecanismo de ação desse tratamento. Estudos com animais tem demonstrado que a acupuntura pode auxiliar na regeneração de nervos pela estimulação de alguns fatores de crescimento (Chen *et al*, 2001; La *et al*, 2005).

Interessantemente, alguns estudos demonstram ainda que a aplicação de acupuntura com pequenas quantidades da peçonha de abelha é eficaz para diminuir

a dor de pacientes com neuropatia periférica induzida por quimioterapia, melhorando significativamente a qualidade de vida desses pacientes, porém ainda necessitam de mais estudos para tornar essa terapia padrão (Yoon *et al*, 2012).

#### **1.4 Toxinas analgésicas de artrópodes**

A grande quantidade de toxinas e venenos existentes atualmente relaciona-se a grande biodiversidade e de milhões de anos de evolução, nos quais várias alterações desde o rearranjo de pequenas moléculas aminas a grandes mudanças em moléculas complexas como proteínas foram realizadas. Existem dois modos dos organismos apresentarem o arsenal de toxinas, eles podem produzi-las com sua própria maquinaria genética e metabolismo ou podem apenas armazenar toxinas produzidas por outros organismos, derivadas da sua alimentação ou do ambiente onde vivem. Dependendo da família, do gênero e da espécie do organismo a funcionalidade e a composição química e estrutural das toxinas mudam (Mebs, 2000).

Sabe-se que artrópodes peçonhentos usam suas toxinas principalmente para defesa contra predadores e/ou paralisia de suas presas (Mortari, 2007; Mebs, 2001). Quando inoculadas em humanos, essas toxinas podem causar reações alérgicas, dor, danos teciduais locais e diversas alterações no SNC como sonolência, paralisia e convulsões. Em especial, devido à elevada afinidade e seletividade ao SNC, o uso de várias dessas toxinas tem sido considerado como potenciais fármacos para diversos distúrbios neurológicos, como epilepsia, Parkinson, Alzheimer e o desenvolvimento de novas drogas analgésicas mais eficazes (Mortari, 2007).

Em relação aos compostos antinociceptivos isolados da peçonha de artrópodes, peptídeos isolados de escorpiões tem recebido grande atenção. As toxinas de escorpiões são usadas para o tratamento de doenças há vários séculos na medicina tradicional chinesa, principalmente para o controle da dor. Estes animais possuem uma peçonha rica em substâncias biologicamente ativas com diferentes alvos moleculares, em especial toxinas peptídicas que atuam em

diferentes canais iônicos, (Possani *et al*, 1999; Kapoor, 2010). Do escorpião chinês *Mesobuthus martensi Karsch* foram isolados dois peptídeos muito similares e com potente atividade antinociceptiva. Ambos os peptídeos BmK AS e BmK AS1 atuam aliviando a dor induzida por carragenina ou formalina a partir da modulação de canais de sódio voltagem dependentes, produzindo um potente efeito antinociceptivo (Tan *et al*, 2001; Chen *et al*, 2006).

Outro grupo de artrópodes que possuem uma grande quantidade de compostos analgésicos são as aranhas. Suas peçonhas são formadas por uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas, que são classificados em dois grupos: os neurotóxicos e os necróticos (citólíticos), de acordo com a sua ação na presa/vítima (Grishin *et al*, 2010).

Em 1996, os pesquisadores Roerig e Howse relataram uma atividade antinociceptiva da peçonha da aranha norte-americana *Agalenopsis aperta*. A toxina ativa, denominada  $\omega$ -agatoxina IVA, atua em canais iônicos de cálcio do tipo P/Q bloqueando-os. As toxinas desse animal foram os primeiros bloqueadores de canais de cálcio deste tipo descobertos e podem trazer benefícios, particularmente, para pacientes tolerantes ou dependentes a opióides (Mortari, 2007). Seguindo a caracterização de  $\omega$ -agatoxinas, uma variedade de toxinas peptídicas que atuam em Canais de Cálcio Voltagem Dependentes (VSCCs) têm sido purificadas, como a  $\omega$ -gramotoxina (Lampe *et al.*, 1993; Piser *et al.*, 1995), toxinas PhTX (Cassola *et al.*, 1998; Guatimosim *et al.*, 1997),  $\omega$ -acatrotoxinas (Fletcher *et al.*, 1997), SNX482 (Newcomb *et al.*, 1998), dentre outras.

A *Psalmopoeus cambridgei*, uma tarântula sul-americana, possui em sua peçonha uma toxina que atua como bloqueadora de canais ASICs (*Acid Sensitive Ionic Channels*), mais especificamente no homomultímero ASIC1a. Essa substância, composta por 40 resíduos de aminoácidos, que recebeu o nome de Psalmotoxina 1 (PcTx1), é capaz de se ligar ao canal iônico de maneira rápida e reversível, mostrando-se muito útil para aliviar a algesia causada pela inflamação (Kellenberger e Schild, 2002).

Em 2010, foi descoberto um novo peptídeo que tem uma ação inédita sobre o receptor purinérgico P2X3, trata-se da primeira molécula natural que atua sobre

esse receptor inibindo sua ação, descrita até o momento. Este peptídeo foi extraído da peçonha de uma aranha da Ásia central denominada *Geolycosa sp.* O peptídeo nomeado purotoxina-1 (PT-1), possui ação analgésica em casos de hiperalgesia provocada por capsaicina ou formalina (Grishin *et al.*, 2010).

Estudos com a peçonha da aranha brasileira *Parawixia bistriata* revelaram a presença de várias toxinas com atividades diversificadas, com destaque para a Parawixina I, uma toxina que aumenta a recaptação seletiva de L-glutamato no SNC pelos transportadores EET2. Este mecanismo específico é muito útil para entender e possivelmente tratar distúrbios relacionados ao excesso de glutamato como a isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, epilepsia, esquizofrenia assim como a dor crônica (Fontana *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2007).

As vespas são artrópodes da ordem *Hymenoptera* que possuem uma potente peçonha capaz de paralisar suas presas ou afugentar o predador. Esta peçonha apresenta compostos com diferentes ações que serão detalhadas com maior atenção a seguir.

### **1.5 Peptídeos de vespa com atividade biológica**

A peçonha de vespas, tanto sociais quanto solitárias, contém uma mistura complexa de compostos formada por aminas biogênicas (<1 kDa), peptídeos (1kDa a 10kDa) e proteínas (>10 kDa) responsáveis por suas variadas atividades biológicas como reações alérgicas, antimicrobiana, ansiolítica, antinociceptiva, anticonvulsivante, hemolítica, entre outras (Nakajima *et al.*, 1986; Mendes *et al.*, 2004; Baptista-Saidemberg, 2011).

Os peptídeos podem ser moléculas constituintes de grande proteínas, responsáveis pelo reconhecimento molecular e pelas atividades biológicas, ou eles podem ser sintetizados isoladamente desempenhando papéis importantes em processos fisiológicos atuando como neurotransmissores, hormônios, toxinas, antibióticos e defensinas (Nakajima *et al.*, 1986).

As aminas biogênicas mais encontradas na peçonha de vespas são: histamina, serotonina, dopamina e epinefrina. Quando injetadas perifericamente, ou no caso de uma picada, a histamina e a serotonina (5-HT) induzem a dor no indivíduo e facilitam a difusão da peçonha na circulação (Dias, 2009), porém quando injetada diretamente no SNC, a serotonina produz uma analgesia significativa, por ativar as vias descendentes de modulação da dor, além de ser anticonvulsivante (Silva, 2011; Paul *et al.*, 2001). A histamina também é responsável por uma vasodilatação considerável levando a um colapso vascular quando em elevadas concentrações (Dias, 2009).

São inúmeras as proteínas presentes na peçonha dos Himenópteros, dentre elas destacam-se as Hialuronidades, Fosfolipases, Serino-Proteases e Antígeno-5. Todas estas proteínas foram inicialmente caracterizadas como alérgenos potentes, ou seja, induzem uma resposta humoral. Outras reações comuns que derivam da ação destes compostos são edema, hemólise e lise celular (Dias, 2009).

Os peptídeos são os responsáveis pela maioria das atividades descritas na peçonha de vespas. Em função do seu tamanho reduzido, essas moléculas são capazes de interagir com vários tipos de células e tecidos podendo causar hipertensão, contração da musculatura, lise celular, quimiotaxia de polimorfonucleares, além de serem antimicrobianos e possuírem atividades neurológicas (Saidembreg, 2011).

Por estarem presentes em grandes quantidades nas peçonhas das vespas e apresentarem funções distintas, os peptídeos foram divididos em classes de acordo com sua atividade biológica mais marcante em: Cininas, Mastoparanos, Quimiotáticos, Antimicrobianos e Neuroativos.

### **1.5.1 Cininas**

A Bradicinina (BK), descoberta em 1948 por Rocha e Silva, é um peptídeo com nove resíduos de aminoácidos (Tabela 1), inicialmente descrito em plaquetas de

mamíferos, sendo liberada na corrente sanguínea pelo sistema cinina-caliceína quando há lesão tecidual ou ativação do fator XII (Mundim, 2008). Em humanos, a BK é codificada pelo gene dos cininogênios localizado no cromossomo 3q26 → qter, o qual contém onze exons, sendo a BK codificada pelo décimo exon (Moreau *et al*, 2005).

Quando presente na corrente sanguínea a BK é rapidamente degradada pelas carboxipeptidases, presentes no pulmão, pela enzima conversora de angiotensina (ECA) e pelas endopeptidases (Conlon, 1999).

Fisiologicamente, a BK e seus derivados participam ativamente do controle da pressão arterial, da função renal e cardíaca, além de terem importante papel na inflamação (Moreau *et al*, 2005). Outra atividade importante dessa molécula é a sua capacidade de contrair músculos lisos, isso é comprovado ao testar em íleo de cobaia, que se contrai com força na presença de BK (Mortari *et al*, 2012).

Sabe-se também que a BK e seus metabólitos participam da regulação de diversos efeitos neuronais. Quando injetada diretamente no SNC de mamíferos ela é capaz de induzir diversos efeitos como: depleção de noradrenalina, hipertemia, hipertensão, liberação de hormônio antidiurético, sedação, catatonia e analgesia (Mortari, 2007).

**Tabela 1:** Sequências primárias e massas moleculares de cininas isoladas de vespas.

Cinina	Espécie	Sequência	Massa Molecular	Referência
Bradicinina	<i>Homo sapiens</i>	RPPGFSPFR	1060.2 Da	
Polistescinina-3	<i>Polistes sp.</i> *	PETNKKKLRGRPPGFSPFR	2211.24 Da	Udenfriend <i>et al.</i> , 1967
Polistescinina-R	<i>Polistes rothneyi</i>	ARRPPGFTPFR	1301.72 Da	Watanabe <i>et al.</i> , 1976
Polistescinina-J	<i>Polistes jadvigae</i>	RRRPPGFSPFR	1372.77 Da	Nakajima <i>et al.</i> , 1984
Polistescinina-C	<i>Polistes chinensis</i>	SKRPPGFSPFR	1275.69 Da	Nakajima <i>et al.</i> , 1984
Polistes-protonectina	<i>Polistes rothneyi iwatai</i>	ILSALLGLLKSL	1222.9 Da	Murata <i>et al.</i> , 2006
Thr6-Bradicinina	<i>Polistes rothneyi iwatai</i>	RPPGFTPFR	1074.5 Da	Murata <i>et al.</i> , 2006
A-R-Thr6-Bradicinina	<i>Polistes rothneyi iwatai</i>	ARRPPGFTPFR	1301.6 Da	Murata <i>et al.</i> , 2006
PMM1	<i>Polistes major major</i>	KRRPPGFTPFR	1357.77 Da	Cerovsk <i>et al.</i> , 2007
Peptídeo I	<i>Polistes gallicus</i>	IKAGGIVK KKL	1154.79 Da	Mukhamedov <i>et al.</i> , 1991
Peptídeo II	<i>Polistes gallicus</i>	LAIPFCFGRPRGFSPFR	1968.04 Da	Mukhamedov <i>et al.</i> , 1991
Peptídeo III	<i>Polistes gallicus</i>	FKLVKRPPGFSPFR	1675.97 Da	Mukhamedov <i>et al.</i> , 1991
Peptídeo IV	<i>Polistes gallicus</i>	IRPPGFSPFRV	1272.72 Da	Mukhamedov <i>et al.</i> , 1991
Peptídeo V	<i>Polistes gallicus</i>	FKVPKKGVFTSPL	1447.86 Da	Mukhamedov <i>et al.</i> , 1991
Peptídeos VI	<i>Polistes gallicus</i>	IRPVGFSPFRS	1363.74 Da	Mukhamedov <i>et al.</i> , 1991
Protopolybiacinina-I	<i>Protopolybia exigua</i>	DKNKKPIRVGGRRPPGFTPFR	2422.8 Da	Mendes e Palma, 2006
Protopolybiacinina-II	<i>Protopolybia exigua</i>	DKNKKPIWMAGFPGFPIR	2202.7 Da	Mendes e Palma, 2006
Vespacinina-M	<i>Vespa mandarinia</i>	GRPHypGFSPFRID	1379.77 Da	Kichimura <i>et al.</i> , 1976
Vespacinina-X	<i>Vespa xanthoptera</i>	ARPPGFSPFRIV	1343.75 Da	Yasuhara <i>et al.</i> , 1977
Vespacinina-A	<i>Vespa analis</i>	GRPPGFSPFRVI	1329.74 Da	Gobbo <i>et al.</i> , 1995
Vespacinina-T	<i>Vespa tropica</i>	GRPHypGFSPFRVV	1349.8 Da	Gobbo <i>et al.</i> , 1995
Thr6-Bradicinina	<i>Chiphononix fulvognathus</i>	RPPGFTPFR	1074.5 Da	Picolo <i>et al.</i> , 2010
Fulvocinina	<i>Chiphononix fulvognathus</i>	SIVLRGKAPFR	1243.8 Da	Picolo <i>et al.</i> , 2010
Cyphocinina	<i>Chiphononix fulvognathus</i>	DTRPPGFTPFR	1290.7 Da	Picolo <i>et al.</i> , 2010
Cd-146	<i>Chiphononix fulvognathus</i>	SETGNTVTVKGFSPLR	1692.9 Da	Picolo <i>et al.</i> , 2010
Thr6-Bradicinina	<i>Polybia occidentalis</i>	RPPGFTPFR	1074.8 Da	Mortari <i>et al.</i> , 2007
Thr6-Bradicinina	<i>Megascolia flavifrons</i>	RPPGFTPFR	1074.8 Da	Yasuhara <i>et al.</i> , 1987
Megascoliacinina	<i>Megascolia flavifrons</i>	RPPGFTPFRKA	1273.71 Da	Yasuhara <i>et al.</i> , 1987

\* Pool de peçonhas das vespas norte-americanas: *Polistes fuscatus*, *P. esclamans* e *P. annularis*.

As vespas sociais apresentam em suas peçonhas uma grande variedade de cininas as quais apesar de já terem sido caracterizadas bioquimicamente ainda não possuem suas atividades farmacológicas completamente elucidadas (Saidemberg, 2011). Suspeita-se que estas moléculas são as responsáveis pelas dores intensas e pela inflamação causadas no local da inoculação da peçonha em humanos e podem também ter alguma participação na paralização de presas ou ameaças ao ninho (Turillazi, 2006; Saidemberg, 2011; Piek, 1990).

A maioria das cininas de vespas possuem regiões extremamente conservadas em relação à BK (tabela 1). A treonina-6-BK (Thr<sup>6</sup>-BK) é a mais conservada, apresentando mudança apenas da serina na posição 6 do peptídeo, tornando-a mais estável (Mortari, 2007).

É interessante perceber os efeitos antagônicos da mesma molécula no SNC e na periferia do organismo. Quando a BK é administrada via i.c.v. provoca hipertensão e uma analgesia poderosa, cerca de duas vezes mais potente que a morfina. Porém, quando injetada perifericamente a mesma molécula causa

hiperalgesia, inflamação e hipotensão (Mortari, 2007; Pelá *et al*, 1996; Couto *et al*, 1998). Segundo Mortari e colaboradores (2007), após testes de indução algésica por estímulos térmicos, *hot-plate* e *tail flick*, ficou determinado que a Thr6-BK proporciona respostas antinociceptivas quando injetadas diretamente no SNC de ratos, de maneira dose dependente e quatro vezes maior que a morfina.

### 1.5.2 Mastoparanos

Os mastoparanos são os componentes peptídicos mais abundantes na peçonha das vespas (Tabela 2). Presentes apenas nesses animais, apresentam semelhanças estruturais e funcionais com a melitina, um peptídeo presente na peçonha de abelhas, e com a bombinina, encontrado na pele do sapo *Bombina variegata* (Csordàs e Michl 1970; Argiolas e Pisano, 1983; Saidemberg, 2011).

Estruturalmente, os mastoparanos são peptídeos anfifílicos e apresentam-se em conformação  $\alpha$ -hélice, sem cisteínas em sua sequência primária que possui de 10 a 14 resíduos de aminoácidos (Nakajima *et al*, 1986). A grande quantidade de resíduos de lisina em suas cadeias tem como provável função facilitar a liberação de histamina dos mastócitos e conferir carga positiva à molécula aumentando sua afinidade com membranas biológicas que apresentem carga negativa (Higashima *et al*, 1990; Konno *et al*, 2000).

Como componente da peçonha de vespas sociais e solitárias, o mastoparano está envolvido na ocorrência de inflamações, lise de membranas celulares, degranulação de mastócitos (sua principal característica funcional), liberação de histamina e conseqüente vasodilatação; indução de quimiotaxia de neutrófilos e células T helper, resultando no recrutamento de outros leucócitos para o local inflamado (Hancock e Diamond 2000). Outra ação importante dos mastoparanos que levam ao aumento da lesão tecidual e do edema é a ativação da fosfolipase A2 presente na peçonha e no indivíduo picado, diferentemente do que ocorre com a melitina que somente ativa fosfolipase A2 derivada da peçonha da abelha (Argiolas e Pisano, 1984).

Os peptídeos degranuladores de mastócitos encontrados em vespas possuem diversas atividades biológicas além daquela que lhes dá nome. Eles podem atuar como agentes promotores de excitação em diversas células de mamíferos, promovendo a secreção de serotonina a partir de plaquetas e de prolactina na glândula pituitária. Alguns apresentam atividade hemolítica assim como a melitina, porém 10 vezes menor (Tosteson *et al*, 1985).

Outra atividade importante dos mastoparanos que merece destaque é a capacidade desses peptídeos atuarem na transdução de sinal via proteína G (Higashijima *et al*, 1988; Jones e Howl, 2006). Por causa de sua conformação em  $\alpha$ -hélice e da grande quantidade de cargas positivas em sua estrutura, ele apresenta grande facilidade de penetrar a membrana celular, após se estabelecer na membrana ele mimetiza um receptor metabotrópico, tornando-se capaz de ativar a proteína G (Higashijima e Ross, 1991).

**Tabela 2:** Sequência primária e massas moleculares de mastoparanos isolados de vespas sociais e solitárias.

Mastoparano	Espécie	Sequência	Massa Molecular	Referência
App-5	<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	INWKAILERIKMA	1585.92 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
App-7	<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	INWLKLGKAIIDA	1454.87 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
Protonectina	<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	ILGTILLKGL	1040.70 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2004
Agelaia MP-I	<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	INWLKLGKAIIDAL	1567.95 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2004
Anopline	<i>Anoplius samariensis</i>	GLLKRKIKTLL	1154.79 Da	Konno <i>et al.</i> , 2001
EMP-AF	<i>Anterchium flavomarginatum micado</i>	INLLKIAKGIIKSL	1524.02 Da	Konno <i>et al.</i> , 2000
Apoica-MP	<i>Apoica pallens</i>	INWLKIAKKVAGML	1584.96 Da	Palma <i>et al.</i> , 1993
EMP-ER	<i>Eumenes rubronotatus</i>	LNLKGIFKKVASLLT	1645.04 Da	Konno <i>et al.</i> , 2006
Od-6	<i>Orancistroceros drewseni drewseni</i>	GRILSFIKGLAEHL	1553.91 Da	Murata <i>et al.</i> , 2009
Od-8	<i>Orancistroceros drewseni drewseni</i>	ILGIIWSLLKSL	1355.86 Da	Murata <i>et al.</i> , 2009
Parapolybia-MP	<i>Parapolybia indica</i>	INWKKMAATALKMI	1618.91 Da	Toki <i>et al.</i> , 1988
Polistes MP	<i>Polistes jadwigae</i>	VDWKKIGQHILSVL	1635.95 Da	Hirai <i>et al.</i> , 1980
Domilina A	<i>Polistes dominulus</i>	INWKKIAEVGGKILSSL	1856.10 Da	Turillazzi <i>et al.</i> , 2006
Domilina B	<i>Polistes dominulus</i>	INWKKIAEIGKQVLSAL	1911.14 Da	Turillazzi <i>et al.</i> , 2006
Polybia-MPI	<i>Polybia paulista</i>	IDWKKLLDAAKQIL	1654.98 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
Polybia-MPII	<i>Polybia paulista</i>	INWLKLGKVIDAL	1613.94 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
Polybia-MPIII	<i>Polybia paulista</i>	IDWLKLGKVMVDVL	1660.91 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
Polybine I	<i>Polybia paulista</i>	SADIVKKLWDNPAL	1569.86 Da	Ribeiro <i>et al.</i> , 2004
Polybine II	<i>Polybia paulista</i>	SVDMVMKGIKLWPL	1616.89 Da	Ribeiro <i>et al.</i> , 2004
Protonectarina-MP	<i>Protonectarina sylveirae</i>	INWKALLDAAKKVL	1582.96 Da	Dohtsu <i>et al.</i> , 1993
Protopolybia MPI	<i>Protopolybia exigua</i>	INWLKLGKVSAIL	1454.90 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
Protopolybia MPII	<i>Protopolybia exigua</i>	INWKAIEAAKQAL	1568.91 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
Protopolybia MPIII	<i>Protopolybia exigua</i>	INWLKLGKVIDAL	1553.94 Da	Mendes <i>et al.</i> , 2005
P-13	<i>Protopolybia sedula</i>	INWLKLGKKSVAAIL	1583.00 Da	Nakajima <i>et al.</i> , 1986
Rodopalia MP	<i>Rodopalia SP</i>	INWAKLGKLAALQAL	1538.94 Da	Saidemberg, 2011
SC-4	<i>Synoeca cyanea</i>	INWLKLGZKIIISAL	1596.59 Da	Saidemberg, 2011
Mastoparano-A	<i>Vespa analis</i>	IKWAILDVAVKKVL	1496.95 Da	Nakajima <i>et al.</i> , 1986
Mastoparano-B	<i>Vespa basalis</i>	LKLSIESWAKKVL	1643.02 Da	Ho e Hwang, 1991
HP-1	<i>Vespa basalis</i>	LFRLIAKTLGSLM	1460.70 Da	Ho <i>et al.</i> , 1998
HP-2	<i>Vespa basalis</i>	LFRLANTLTKIL	1469.70 Da	Ho <i>et al.</i> , 1998
HP-3	<i>Vespa basalis</i>	IFGLLAKTLGNLF	1404.80 Da	Ho <i>et al.</i> , 1998
Mastoparano-C	<i>Vespa cabro</i>	INWKALLAVAKKIL	1581.02 Da	Argiolas e Pisano, 1984
Mastoparano	<i>Vespula lewisii</i>	INLKALAALAKKIL	1479.99 Da	Hirai <i>et al.</i> , 1979a
Mastoparano-M	<i>Vespa mandarina</i>	INLKAI AALAKKLL	1479.99 Da	Hirai <i>et al.</i> , 1981
HR-I	<i>Vespa orientalis</i>	INLKALAALVKKVL	1494.01 Da	Tuichbaev <i>et al.</i> , 1988
HR-II	<i>Vespa orientalis</i>	FLPLILGKLVKGLL	1524.02 Da	Tuichbaev <i>et al.</i> , 1988
Mastoparano-II	<i>Vespa orientalis</i>	INLKALLAVAKKIL	1508.02 Da	Nazimov <i>et al.</i> , 1980
Mastoparano-T	<i>Vespa tropica</i>	INLKAI AAFAKKIL	1513.98 Da	King <i>et al.</i> , 2003
Mastoparano-X	<i>Vespa xanthoptera</i>	INWKGIAAMAKKLL	1556.93 Da	Hirai <i>et al.</i> , 1979b
Mastoparano-V	<i>Vespa affinis</i>	INWKGIAAMAKKLL	1556.93 Da	Lin <i>et al.</i> , 2011
Mastoparano-AF	<i>Vespa velutina</i>	INLKAI AALAKKLF	1513.98 Da	Lin <i>et al.</i> , 2011
Mastoparano-VI	<i>Vespula vulgaris</i>	INWKKIKSIIKAAMN	1758.04 Da	King <i>et al.</i> , 2003
Mastoparano-V2	<i>Vespula vulgaris</i>	INWKKIKSLIKAAMS	1731.03 Da	King <i>et al.</i> , 2003

### 1.5.3 Quimiotáticos

Além dos mastoparanos, outra classe de peptídeo encontrada abundantemente na peçonha de vespas são os quimiotáticos (Ves-CPs), os quais atuam, principalmente, induzindo a resposta quimiotática celular de polimorfonucleados e macrófagos, mas também podem ser antimicrobianos e hemolíticos. Estruturalmente, esses peptídeos se assemelham muito aos mastoparanos e, curiosamente, a alguns peptídeos isolados da secreção cutânea de

anfíbios compartilhando, por vezes, as mesmas ações (Yu *et al*, 2007; Nakajima, 1986).

Os peptídeos quimiotáticos são tridecapeptídeos organizados em formato  $\alpha$ -hélice possuem muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, todos localizados em uma mesma porção da molécula, enquanto os resíduos básicos se encontram na região oposta (Baptista-Saidemberg, 2011; Souza, 2005; Mendes, 2004).

Presentes em várias espécies de vespas, os quimiotáticos, já foram encontrados na peçonha da *Vespa tropica*, *V. mandarina*, *V. analis*, *V. cabro*, *V. xanthoptera*, *V. orientalis*, *Paravespula lewisii*, *Agelaia pallipes pallipes*, *Protonectina silveirae*, *Polybia paulista*, *Vespa magnifica* e *Polistes rothneyi iwata* (para revisão ver Baptista-Saidemberg, 2011).

Algumas características estruturais dos quimiotáticos são interessantes de serem observadas. Existem diferenças estruturais em peptídeos isolados de vespas em clima tropical e de clima frio, uma delas é a diminuição de um resíduo de aminoácidos entre os peptídeos quimiotáticos isolados de vespas em regiões mais frias e daqueles isolados de vespas em regiões tropicais, os primeiros apresentam 13 e os outros 12 resíduos, além disso, a sequência FLP também está presente na maioria dos peptídeos daqueles insetos de regiões frias e ausente nos de regiões tropicais (Souza *et al*, 2005; Mendes *et al*, 2004).

O peptídeo quimiotático mais estudado é a protonectina, isolado primeiramente por Dohtsu e colaboradores em 1993 da vespa social *Protonectarina sylveirae*. Está presente também na peçonha da *Agelaia pallipes pallipes*, quanto a sua atividade biológica trata-se de um peptídeo polifuncional com atividade hemolítica, quimiotática e antimicrobiana (Baptista-Saidemberg, 2010; Mendes, 2004).

#### 1.5.4 Neuroativos

Os artrópodes peçonhentos possuem uma grande variedade de substâncias neuroativas em suas peçonhas, denominadas neurotoxinas, capazes de interagir com alvos distintos no sistema nervoso. Por terem sido desenvolvidas e aprimoradas durante milhares de anos, são moléculas muito específicas e têm sido utilizadas como ferramentas para o estudo e elucidação dos mecanismos moleculares da neurotransmissão (desde mecanismos das funções neuronais como a elucidação de canais iônicos ou a caracterização das funções dos receptores) (Harvey *et al* 1993). Outra utilidade dessas neurotoxinas seria sua aplicação biotecnológica no desenvolvimento de bioinseticidas e o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de diversas neuropatologias como epilepsia, doença de Parkinson, ansiedade e até mesmo a dor patológica (Belleboni *et al*, 2004; Mortari *et al*, 2007).

O peptídeo neuroativo AvTx8, isolado da vespa social *Agelaia vicina*, apresentou efeitos ansiolíticos similares ao Baclofen®, quando injetado diretamente na *substantia nigra, pars reticulata* (SNpr) de *Rattus norvegicus*. Foi observado um efeito anti-panico potente, visto que no modelo experimental utilizado o bloqueio de receptores de GABA<sub>A</sub> dessa via resultam em um comportamento de fuga vigoroso no grupo controle, não observado nos animais tratados com a toxina nem com o Baclofen® (Oliveira *et al*, 2005).

Outra vespa que apresenta em sua peçonha um potencial ansiolítico é a *Polybia paulista*, Couto e colaboradores (2012), estudaram os efeitos neurológicos em ratos Wistar da fração de baixa massa molecular (até 3000 Da) dessa vespa injetada via i.c.v. Foi observada atividade ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado, um teste que se baseia no medo natural dos animais por lugares abertos e elevados. A dose de 350 µg/animal (maior dose testada) dos compostos de baixa massa molecular reduziu a ansiedade dos animais significativamente e com efeitos colaterais mínimos, mostrando-se melhor que o benzodiazepínico utilizado na clínica, o Diazepam. Também em sua maior dose, os compostos de baixa massa molecular da vespa *P. paulista* apresentaram efeito anticonvulsivante em modelos de indução de convulsão aguda por PTZ.

Quando a peçonha bruta da vespa social *Polybia ignobilis*, assim como de outras vespas, é injetada via i.c.v. ocorre um potente efeito neurotóxico causado pelos compostos de alta massa molecular (Palma *et al*, 1996; Cunha *et al*, 2005). Porém os compostos de baixa massa molecular dessa peçonha quando injetados pela mesma via são capazes de bloquear crises convulsivas induzidas por diferentes drogas, como PTZ, bicuculina e ácido caínico, sendo mais efetivos nesse último (Cunha *et al*, 2005). Os compostos de baixa massa molecular da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* também apresentou efeito anticonvulsivante quando injetada via i.c.v. impedindo crises convulsivas induzidas por PTZ, bicuculina, picrotoxina e ácido caínico, aumentando a latência para crises convulsivas comparada ao controle salina (Mortari *et al*, 2007).

Esses estudos demonstram o potencial neuroativo das peçonhas de vespas e incentivam a cada dia a procura por novos peptídeos que podem servir de modelo para novas drogas e ferramentas para estudos moleculares de canais e proteínas. Aumentando o conhecimento científico a cerca de um sistema tão complexo e surpreendente, o Sistema Nervoso.

## **1.6 A vespa *Parachartergus fraternus*.**

Assim como as abelhas e as formigas, as vespas são insetos da ordem *Hymenoptera* pertencentes à família Vespidae, a qual é composta por seis subfamílias: Euparaginae, Massarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, sendo as três últimas eussociais (Mateus, 2005).

Embora não sejam relatados com frequência, acidentes com vespas são muito comuns, suas vítimas podem apresentar desde reações locais simples como edema e dor, a reações anafiláticas severas, levando o paciente a óbito (Ito *et al*, 2012). Por estarem adaptados ao convívio humano, frequentemente constroem seus ninhos em áreas urbanas, atacando quando ameaçadas ou na fase de enxameamento (Silva, 2007). No Brasil, os acidentes envolvendo esses animais são

negligenciados, não havendo nenhum estudo epidemiológico relatando incidentes dessa natureza (Mortari *et al.*, 2012).

A vespa *Parachartergus fraternus* pertence à tribo Epiponini, subfamília Polistinae. Esta vespa possui uma ampla distribuição pela América do Sul, da Guiana Francesa às regiões sudeste e centro-oeste brasileiras, habitando preferencialmente áreas de cerrado. Seus ninhos são caracterizados pela presença de envólucro, normalmente localizados em regiões altas e de difícil acesso. Em caso de perturbação, os ninhos são abandonados, além de serem muito vulneráveis a ataques de formigas e outros parasitas (Mateus, 2005).

As vespas da subfamília Polistinae são normalmente muito agressivas, quando se sentem ameaçadas, além das múltiplas picadas elas esguicham sua peçonha na direção do predador, desorientando-o (Jeanne e Keeping, 1995). Diferentemente de outras vespas sociais que utilizam sua peçonha apenas em situações extremas para defesa do ninho, a *P. fraternus* utiliza sua peçonha para subjugar e paralisar as presas, comportamento semelhante ao de vespas solitárias (Olson, 2000).

Até o presente momento, houve apenas um estudo com a peçonha da *P. fraternus* realizado por Mortari e colaboradores (2011). Neste estudo, os pesquisadores demonstraram os efeitos periféricos da peçonha bruta em roedores, além de testes *in vitro*. Foram avaliadas as atividades edematogênica, hemorrágica, hemolítica e antimicrobiana, além da dose letal 50. Nesse estudo ficou evidenciada a capacidade edematogênica, pois com apenas 12,5 µg de peçonha bruta foi observado um edema considerável na pata do animal. Observou-se também uma ação antimicrobiana significativa resultando em uma inibição de crescimento de 93% das bactérias testadas, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, na dose de 100 µg/mL.

## 2 Objetivos

### 2.1 Geral

Considerando-se a necessidade da caracterização de novos compostos neuroativos que possam ser utilizados como ferramentas para o estudo da dor, bem como novas estratégias terapêuticas no tratamento de neuropatologias, o objetivo do presente projeto é:

- ✓ Testar o potencial antinociceptivo dos compostos peptídicos presentes na peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*.

### 2.2 Específicos

- ✓ Isolar peptídeos da peçonha das vespas sociais *P. fraternus* através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Avaliar a pureza e obter a sequência de aminoácidos dos peptídeos neuroativos através de espectrometria de massa (MALDI - TOF/TOF);
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva dos compostos isolados e do peptídeo sintetizado utilizando modelos de indução de dor por estimulação térmica (testes *tail flick* e *hot plate*);
- ✓ Avaliar os perfis farmacológicos destes compostos através de curvas de dose-efeito e tempo-efeito.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Coleta**

Foram coletados dois ninhos da vespa social *Parachartergus fraternus* na região Centro-Oeste em Brasília-DF, ambos com a devida autorização de acordo com a Instrução Normativa nº 154, de março de 2007 do IBAMA (licença do IBAMA número 21723-1).

Os espécimes de artrópodes coletados foram gentilmente identificados pelo Prof. Dr. Fernando B. Noll do Departamento de Zoologia e Botânica da Unesp e exemplares foram depositados na Coleção de Hymenopteras da UNESP e na Coleção do Laboratório de Toxinologia da UnB.

#### **3.2 Preparação da peçonha**

Após a coleta, os exemplares foram eutanasiados por congelamento para posterior retirada da peçonha. Os reservatórios contendo a peçonha bruta e as glândulas produtoras de peçonha foram retirados com uma pinça e acondicionados em um tubo do tipo eppendorf, durante este processo, todo o material foi mantido resfriado a 4°C. Em seguida, este material foi macerado, homogeneizado em água deionizada e centrifugado a 10.000 xg por 3 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi retirado, congelado e seco a vácuo (*speedVac*), obtendo-se assim os compostos brutos da peçonha.

A peçonha bruta então foi solubilizada em 1:1 de água e acetonitrila e ultrafiltrada em um filtro Microcon (Millipore®). Ao final obteve-se apenas os compostos com massas moleculares inferiores a 3000 Da, denominados compostos de baixa massa molecular (CBMM).

### 3.3 Separação dos componentes

O isolamento dos componentes da peçonha foi realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema Shimadzu® Prominence. Foi utilizada uma coluna semi preparativa de fase reversa (C18 ODS, 15  $\mu$ m, 250 x 10 mm Phenomenex®) utilizando 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, como solvente A e 0,1% de TFA em acetonitrila, como solvente B, em gradiente linear, com fluxo de 1,5 mL/ min. A absorvância foi monitorada a 216 e 280nm, sendo as frações coletadas manualmente, e secas a vácuo.

### 3.4 Identificação da massa molecular e sequenciamento

Após a separação, as frações cromatográficas foram submetidas a espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics®, Alemanha) para identificação das massas moleculares presentes em cada fração. Para isso, as frações foram ressuspensas em água deionizada e misturadas a uma matriz de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxi-cinâmico volume a volume. Posteriormente essa mistura foi aplicada em triplicata em uma placa Bruker MTP Massive 384, após a cristalização, as amostras estavam prontas para análise.

Para a obtenção dos espectros de Massa (MS), o equipamento foi operado no modo refletido positivo, que possui maior acurácia para a determinação de massas diferentes. Já para a obtenção das sequencias, espectro MS/MS, foi utilizado o método LIFT.

A interpretação dos espectros obtidos e o sequenciamento *de novo* foram realizados manualmente e com o auxílio do *software* FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Alemanha). As buscas por similaridades foram feitas com métodos de bioinformática online, BLASTP e Fasta.

A identificação das massas moleculares e o sequenciamento foram realizados em parceria com a EMBRAPA – CENARGEN, com auxílio do Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva.

Após os testes preliminares, a fração que apresentou atividade antinociceptiva foi sintetizada pela empresa AminoTech P&D®. A correta sequência e a pureza do peptídeo sintetizado foi avaliada utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente para a avaliação do peptídeo natural.

### **3.5 Alinhamento**

A sequência de aminoácidos do peptídeo foi comparada com outras sequências disponíveis em bancos de dados por meio do programa MPsrch (<http://www.ebi.ac.uk/MPsrch/>). O alinhamento das sequências foi realizado pela ferramenta de múltiplos alinhamentos Clustal W disponível no software Bioedit v.7.0.4.1.

### **3.6 Bioensaios**

#### **3.6.1 Animais**

Os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA, 2008) e o Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings (Sociedade de Fisiologia Americana – APS, 2000) foram seguidos. Além disso, esta pesquisa foi devidamente submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/ IB) da Universidade de Brasília, sob o seguinte número de protocolo UnBDoc nº 63878/2011. O certificado encontra-se anexado ao final.

Camundongos Swiss machos (16g a 20g) foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os animais experimentais foram acondicionados, seis por gaiola, e mantidos em biotério de

manutenção com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura (25°C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período experimental, foram oferecidas água e alimentação *ad libitum*.

### 3.6.2 Procedimento experimental

Para a avaliação da atividade neurofarmacológica, os compostos foram injetados por via intracerebroventricular, conforme o procedimento descrito a seguir. Os animais foram anestesiados com uma solução salina de cetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e após o efeito da anestesia foram fixados em um estereotáxico (*Insight®*). Foi realizada injeção local de lidocaína (2%) e norepinefrina (0.01%), um anestésico local e vasoconstritor, respectivamente. Logo a seguir o crânio do animal foi exposto para a implantação de uma cânula guia no Ventrículo Lateral (VL): AP – 0,21 mm, ML – 1,0 mm, DV – 2,3 mm, tendo como base a linha do bregma, de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (1997). Foram realizadas duas perfurações no crânio do animal uma para a implantação da cânula e outra para fixar um parafuso que auxilia na permanência do acrilato dental, aumentando a durabilidade do capacete (Figura 2).

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

Ao fim da neurocirurgia, os animais foram encaminhados ao biotério de manutenção sob as condições anteriormente relatadas. Após 4-6 dias de recuperação, foram realizados os bioensaios. Para a realização destes foram injetadas as doses pela cânula guia, com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus®), no volume final de 1 µL.

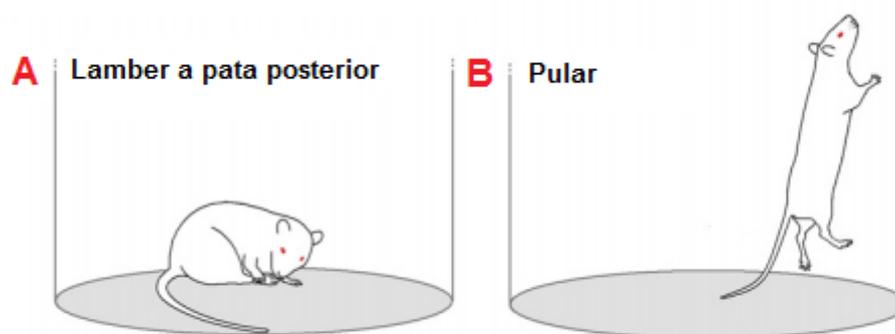


**Figura 2:** Estereotaxia para implantação da cânula guia, a direita, no ventrículo lateral e o parafuso balanceador e fixador do capacete posicionado no lado contralateral.

### **3.7 Testes experimentais**

#### **3.7.1** Teste da placa quente (*hot plate*)

No teste da placa quente (AVS projetos®), os animais foram colocados em uma cuba de acrílico sobre uma placa quente de alumínio a  $55.5 \pm 0.5$  °C. Os parâmetros de observação foram: as latências de fuga do aparelho (pulo) e lambidas e apenas das patas traseiras (Figura 3).



**Figura 3:** Etograma de comportamentos de nocicepção apresentados pelo animal no teste da placa quente (modificado de Casarrubea et al., 2011).

Previamente ao dia do teste, os animais foram pré-avaliados, e os que não responderam ao estímulo térmico, foram removidos do experimento. No dia do teste, foi determinada uma linha de resposta basal constituída da média de três latências de escape obtidas em intervalos de 5 min antes da sessão teste. As latências de escape foram registradas após os tratamentos nos seguintes intervalos de tempo: 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min, 24 h e 3 dias. Grupos independentes de animais (n=6, por grupo) foram tratados com veículo, morfina (20 µg/animal), frações da peçonha ou o peptídeo, todos injetados por via i.c.v.

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

$$IA = \frac{(LA \text{ do teste}) - (\text{latência média basal})}{\text{Tempo limite} - (\text{latência média basal})}$$

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

### 3.7.2 Teste da retirada de cauda (*tail-flick*)

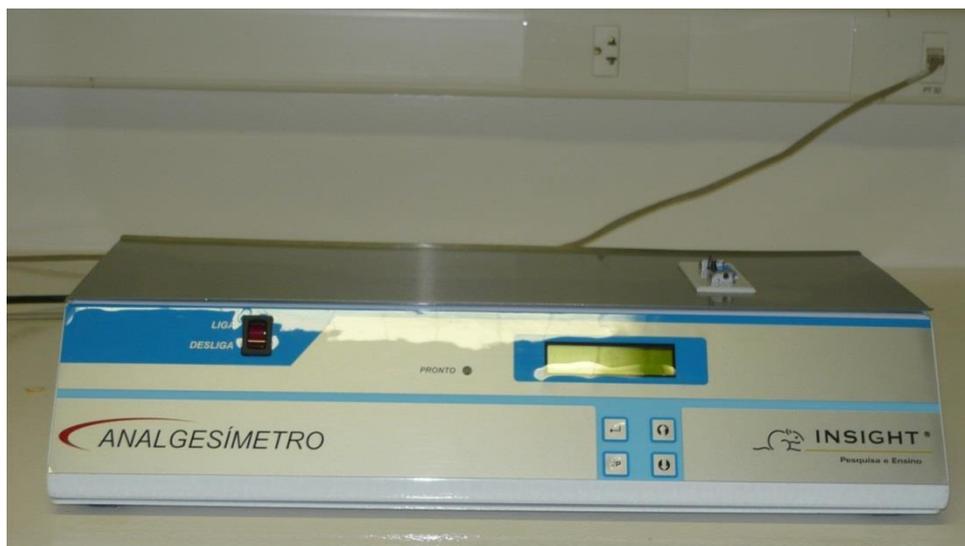
Nesse teste, o animal foi colocado sobre o equipamento (Analgesímetro - *Insight*) e sua cauda posicionada sobre um filamento de nicromo, o qual é aquecido após a passagem de corrente elétrica. A corrente eleva a temperatura do filamento na taxa de 9 °C/s, sendo o aparelho calibrado para diminuir a temperatura quando esta chega a 75°C, evitando assim lesões na pele do animal (Figura 4).

Assim como mencionado no teste acima, foram registradas as medidas de base antes do ensaio com os tratamentos em intervalos de cinco minutos antes da sessão teste. As latências de escape foram registradas após os tratamentos nos seguintes intervalos de tempo: 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min, 24 h e 3 dias. Grupos independentes de animais (n=6, por grupo) foram tratados com veículo, morfina (20 µg/animal), frações da peçonha ou o peptídeo, todos injetados por via i.c.v.

Neste teste o Índice de Antinocicepção com relação a Temperatura de escape e não ao tempo de permanência no equipamento como realizado no teste da retirada de cauda.

$$IA = \frac{(\text{Temperatura de escape}) - (\text{Temperatura média basal})}{(\text{Temperatura máxima}) - (\text{Temperatura média basal})}$$

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



**Figura 4:** Analgesímetro digital Insight® utilizado para a realização do teste de retirada de cauda.

### 3.8 Análise histológica

Após os experimentos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e em seguida, foram injetados 10 µL de azul de metileno pela cânula guia para verificar sua posição correta. Posteriormente, o encéfalo do animal foi retirado e colocado em uma solução de formol a 4%, assim foi possível realizar um corte na região do ventrículo. A coloração azul em ambos os ventrículos laterais indicou a correta posição da cânula.

### 3.9 Análises estatísticas

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

## 4 Resultados

### 4.1 Coleta e Extração da peçonha

Foram coletados dois ninhos de *Parachartergus fraternus* com aproximadamente 2500 indivíduos no total. Destes foram extraídas 2380 glândulas, o que resultou após os processos de filtração e secagem em 240 mg de compostos de baixa massa molecular (CBMM até 3000 Da), sendo assim cada indivíduo possui em seu reservatório de peçonha cerca de 0,1 mg de CBMM. A coleta foi realizada manualmente, com as devidas roupas de proteção às sete horas da manhã, período em que há pouca atividade dos indivíduos e que a maioria se encontra na colônia. Coletou-se apenas metade do ninho possibilitando seu reestabelecimento (Figura 5).



**Figura 5:** Colônia de *Parachartergus fraternus* localizada no estacionamento do Instituto Central de Ciências Ala Sul (ICC-Sul) da Universidade de Brasília (UnB) a aproximadamente 3,5 metros do chão.

Imediatamente após a coleta, o ninho foi mantido a baixas temperaturas e levado ao laboratório onde as vespas foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24h.

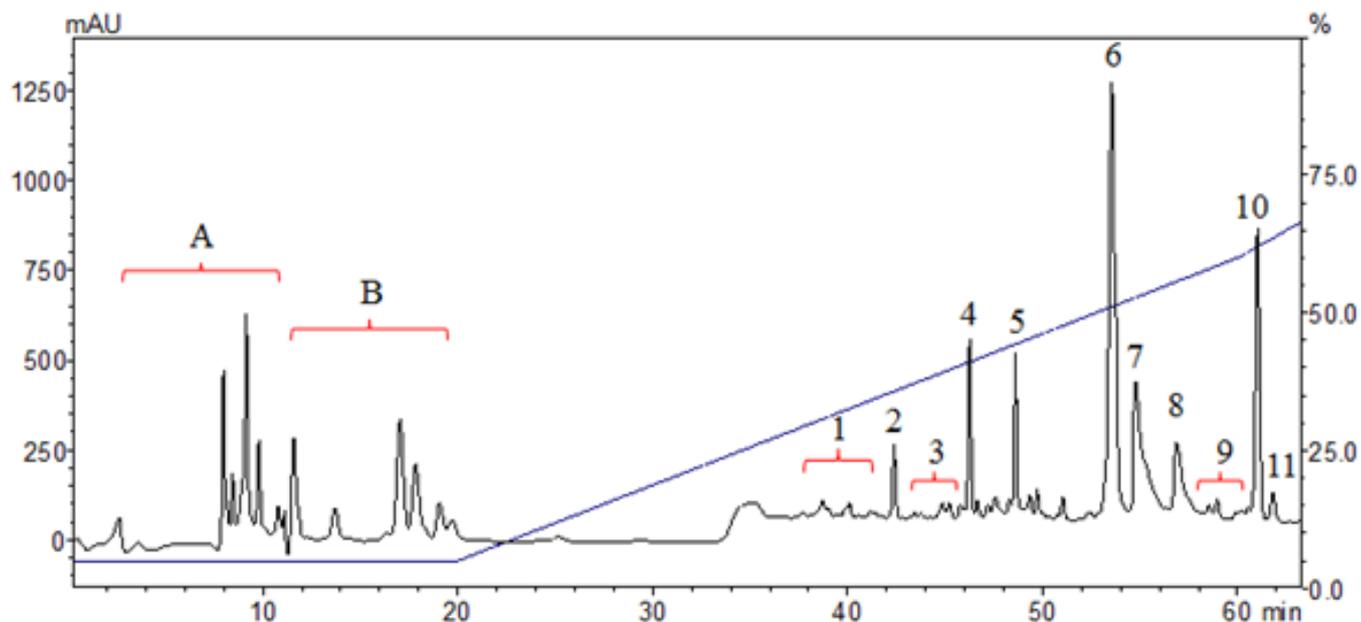
Foram cedidos 10 indivíduos a coleção de Hymenopteras da Unesp coordenada pelo Prof. Dr. Fernando B. Noll, que gentilmente fez a identificação da espécie comprovando sua identidade, *Parachartergus fraternus* (Figura 6).



**Figura 6:**Exemplar de *Parachartergus fraternus*. Foto com lupa no aumento 6x.

#### 4.2 Separação dos componentes da peçonha

Aproximadamente 240 mg do extrato contendo apenas os CBMM foram submetidos a fracionamento por CLAE (4 mg/ procedimento) totalizando 55 repetições. Obteve-se um perfil cromatográfico que foi agrupado em 13 frações, denominadas de *Parachartergus fraternus* toxinas – PfTx A e B e PfTx 1-11 (Figura 7). As frações PfTx 2, 3, 4, 6 e 10 foram testadas e apenas aquela que apresentou atividade antinociceptiva foi sequenciada por MS/MS e sintetizada. Todas as cromatografias foram realizadas em um sistema Shimadzu® Prominence.



**Figura 7:** Perfil cromatográfico dos compostos de baixa massa molecular (até 3000 Da) da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18 ODS, 15 $\mu$ m, 250 x 10 mm), eluição com ACN e TFA por um gradiente isocrático de 5% ACN + TFA 0,1% (20 min), por gradiente linear de 5% até 60% de ACN + TFA 0,1% por 40 min, com um fluxo de 1,5 mL/min. As frações eluídas foram monitoradas a 216 nm. O gradiente de acetonitrila está demonstrado pela linha azul. Em cada cromatografia foram injetadas 4mg de peçonha.

As frações correspondentes às letras A e B são formadas por aminas biogênicas e neurotransmissores, como GABA e glutamato. Como o objetivo do trabalho foi detectar novos peptídeos, que eluem a partir dos 40 minutos como comprovado pela literatura, as frações eluídas antes deste tempo não foram testadas.

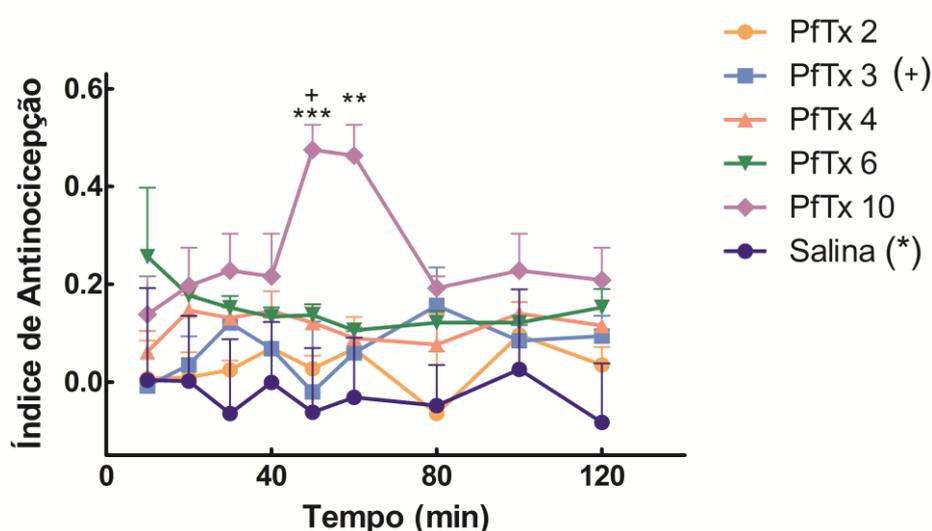
### 4.3 Bioensaios com frações

Após cerca de 30 cromatografias, as frações foram concentradas, quantificadas pelo peso seco e selecionadas para um teste de screening possibilitando conhecer aquela que apresentava melhor atividade antinociceptiva.

**Tabela 3:** Quantificação por peso seco das frações testadas.

<i>Parachartergus fraternus</i> Toxina	Quantidade
PfTx 2	290 µg
PfTx 3	450 µg
PfTx 4	730 µg
PfTx 6	640 µg
PfTx 10	710 µg

O *screening* das frações foi realizado com o auxílio do teste de retirada de cauda. As frações foram administradas e os animais testados durante duas horas em intervalos de 10 minutos na primeira hora e a cada 20 minutos na hora posterior. Foram injetados 20 µg/ animal de cada uma das frações isoladas (n=4), por via intracerebroventricular. Resultado da análise *two-way* ANOVA revelaram diferença significativa entre as frações testadas [ $F_{(5,15)} = 6.379$ ;  $p < 0.01$ ], mas não foram observadas diferenças da interação fração vs. tempo e de tempo. Observou-se uma atividade antinociceptiva significativa na fração PfTx 10 em relação a salina nos 50 e 60 minutos após a administração ( $p < 0.001$  e  $p < 0.01$ , respectivamente). Além disso, aos 50 min, observou-se uma diferença da PfTx 10 e PfTx 3 ( $p < 0.05$ ) (Figura 8).



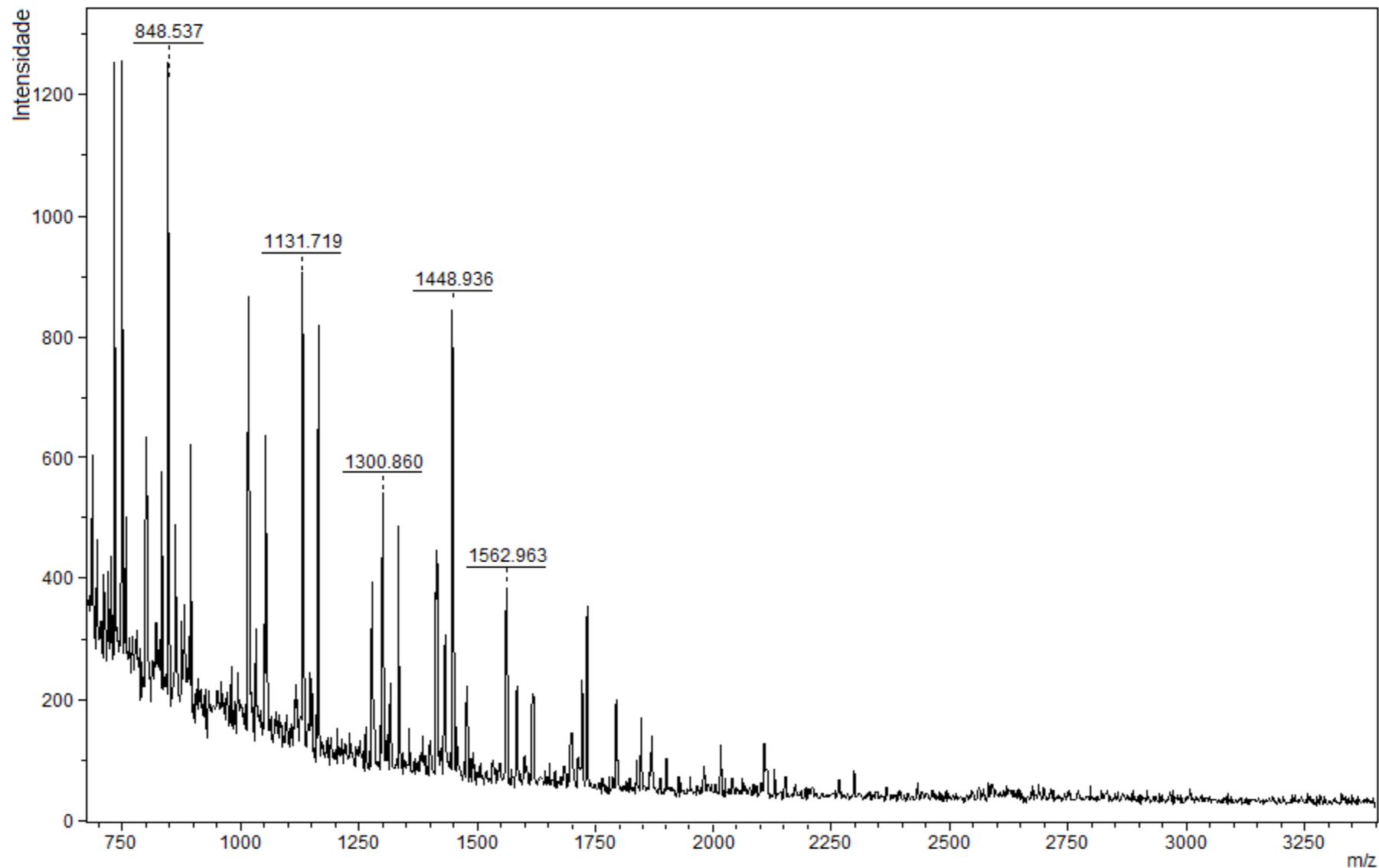
**Figura 8:** Teste de *screening* (*tail-flick*) das frações cromatográficas de *Parachartergus fraternus* injetadas via i.c.v. em camundongos. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-way ANOVA seguido do Bonferroni. \* em relação à salina, + em relação à PfTx 3. \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 4.4 Espectrometria de massa

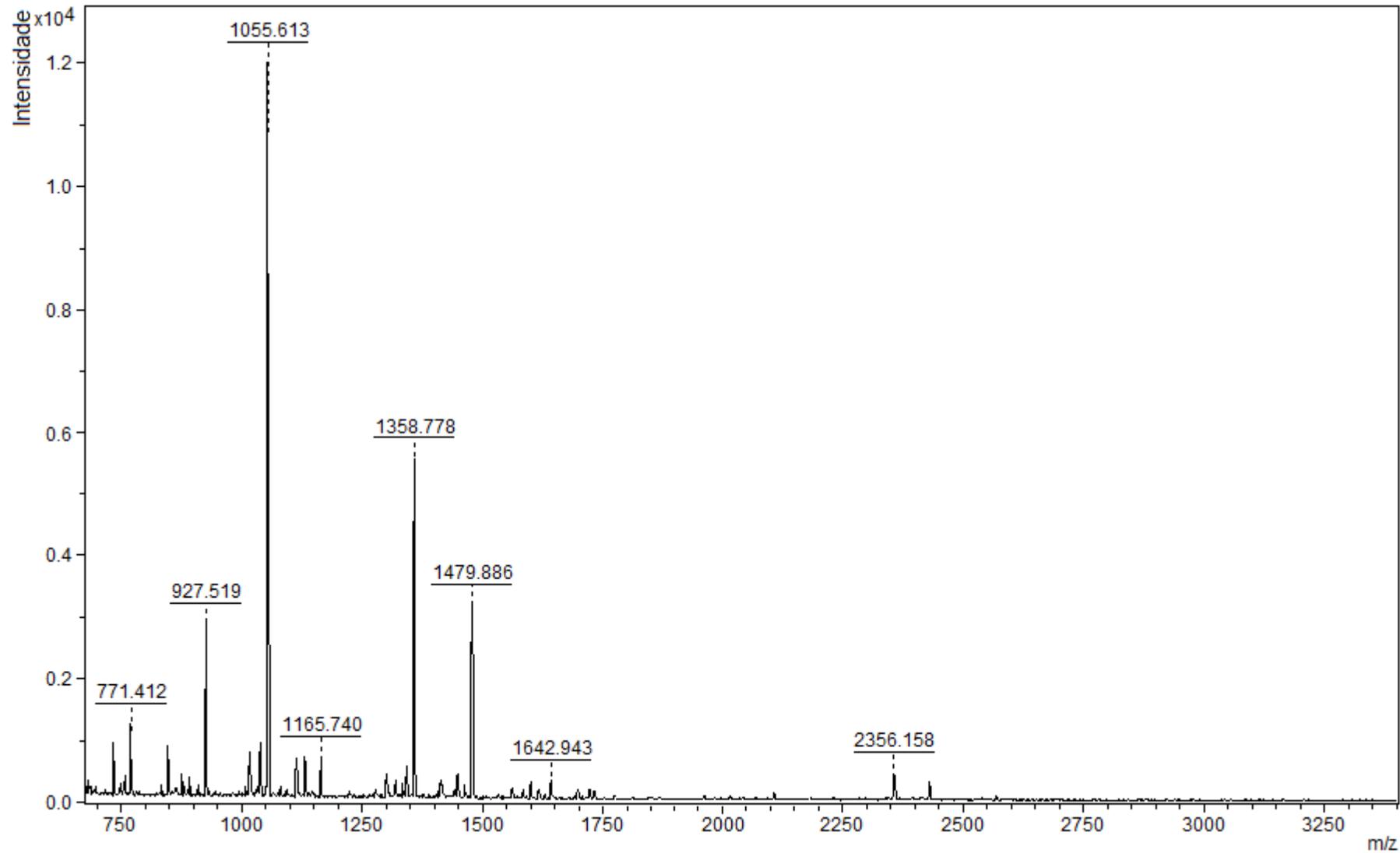
Após a separação dos compostos por CLAE, as frações utilizadas no *screening* foram encaminhadas ao espectrômetro de massa MALDI-TOF para determinação das massas moleculares e avaliação da pureza.

A fração PfTx2 apresentou-se impura, com um sinal muito fraco, por isso nota-se a subida da linha de base no espectro (Figura 9). A fração PfTx 3 apresentou três peptídeos mais abundantes com massas monoisotópicas de 1055.61 Da (majoritária), 1358.77 Da e 1479.88 Da (Figura 10). A fração PfTx 4 (Figura 11) mostrou-se praticamente pura com um sinal intenso de 1358.78 Da, provavelmente a presença desta massa na fração PfTx 3 seja derivada de alguma contaminação. A fração PfTx 6 apresentou uma única massa monoisotópica muito intensa de 2748.50 Da (Figura 12).

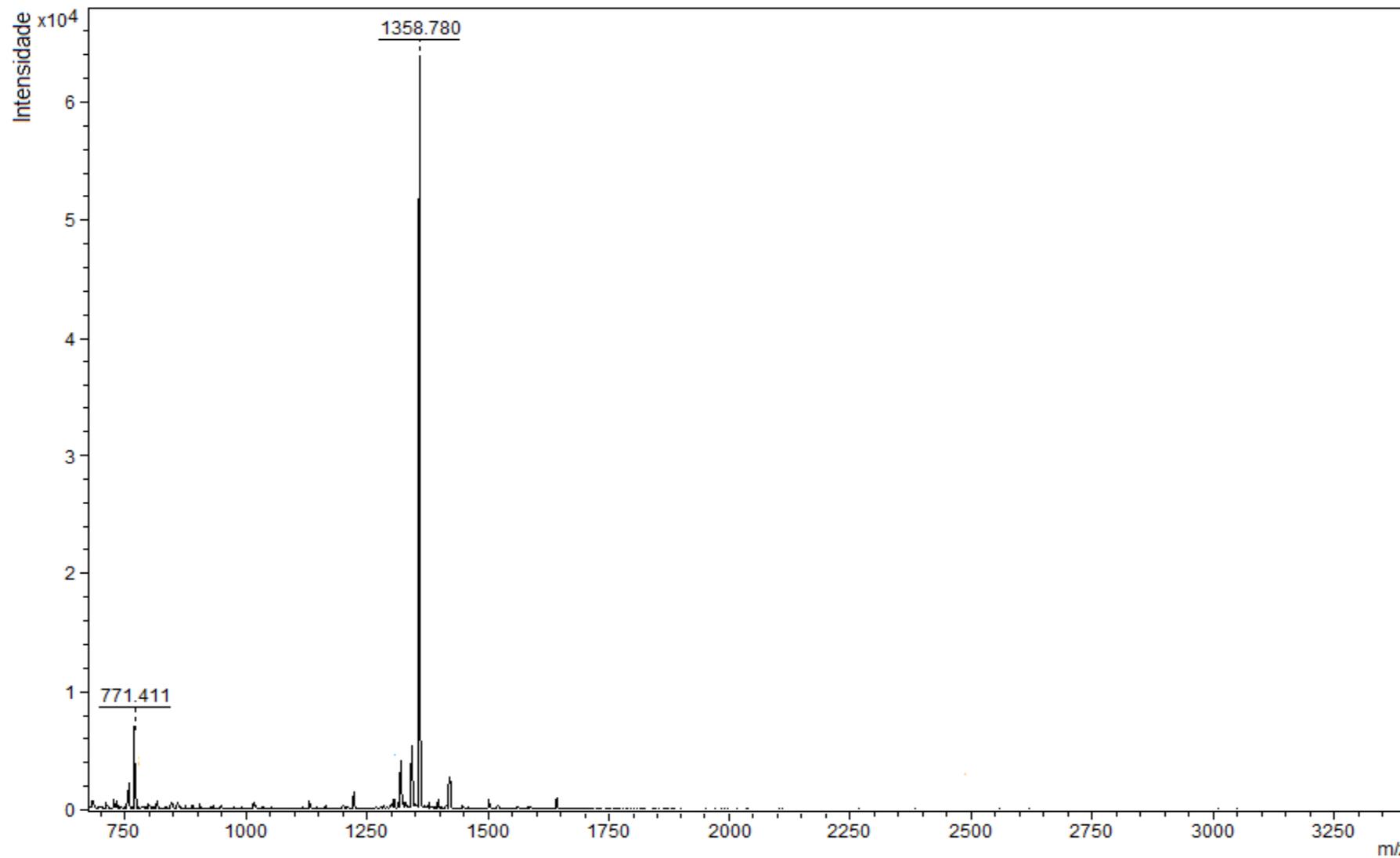
O espectro de massa da fração PfTx 10 revelou a presença de um composto predominante de massa [M+H] 1566.99, seus aductos com sódio [M+Na] 1588.98 e potássio [M+K] 1604.95 (Figura 13). Apenas o composto majoritário foi sequenciado, uma vez que seu sinal foi tão intenso que proporcionou esse sequenciamento.



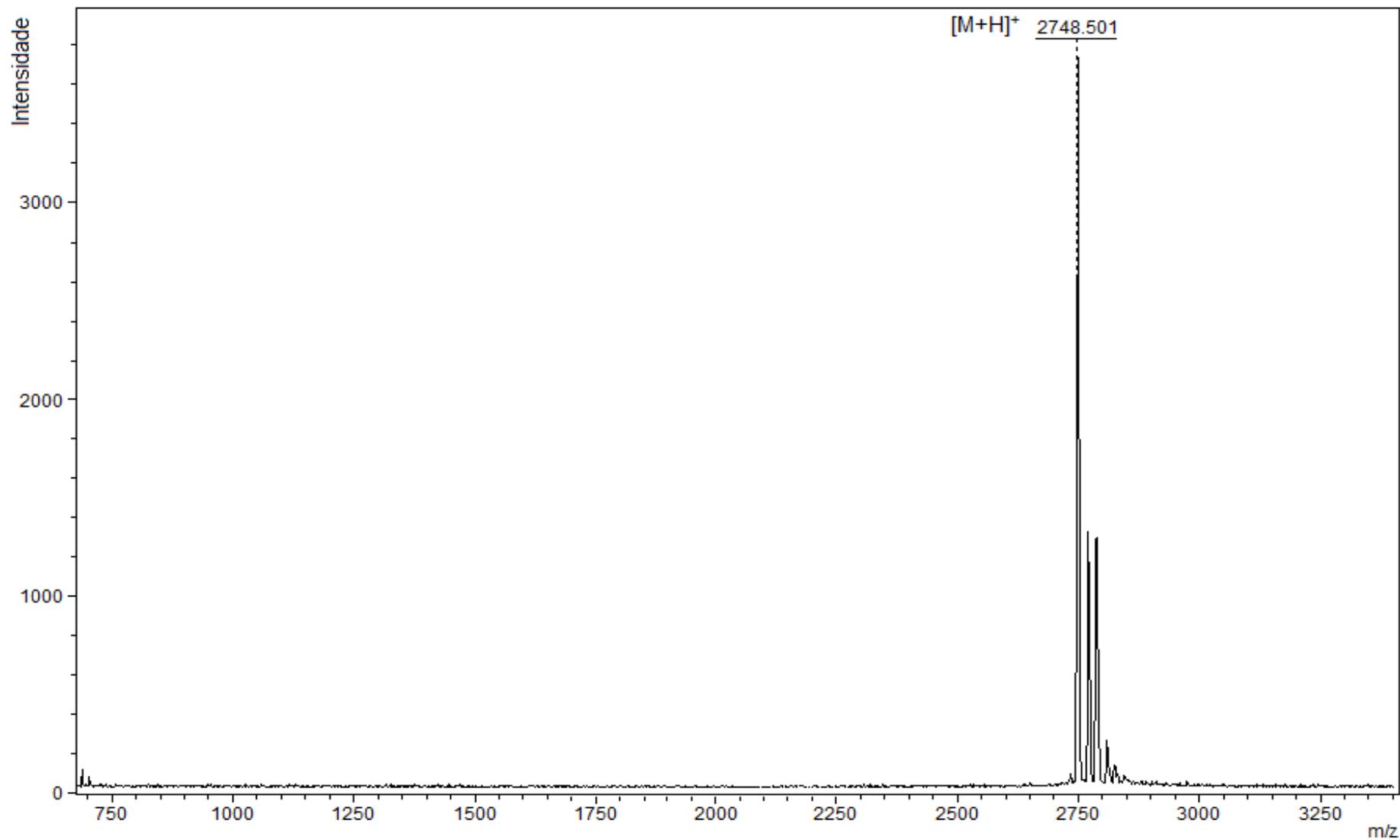
**Figura 9:** Espectro de massa da fração PFTx 2, obtido por MALDI/TOF no modo linear refletido.



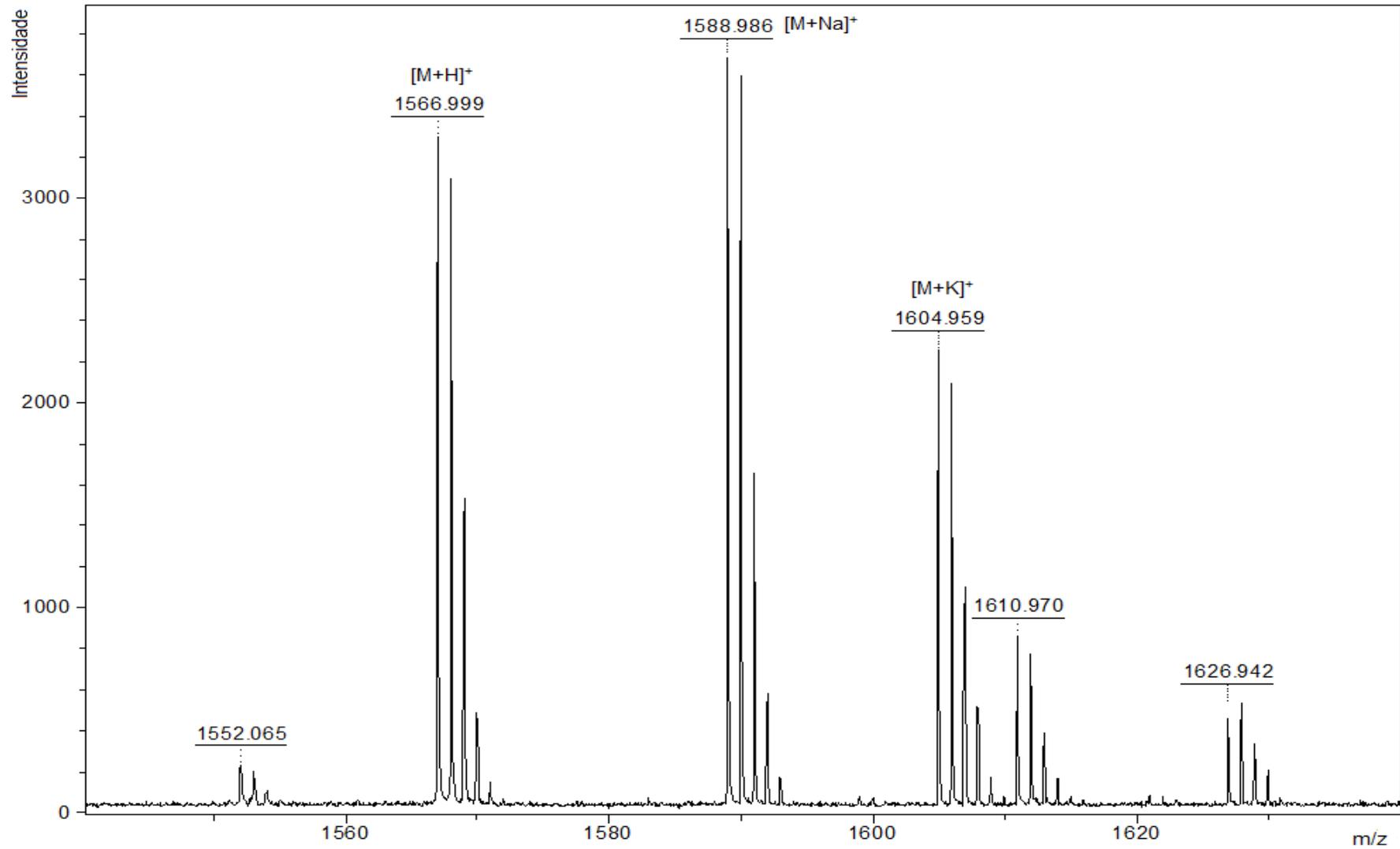
**Figura 10:** Espectro de massa da fração PfTx 3, observa-se compostos com intensidades distintas. O mais intenso é aquele de massa monoisotópica de 1055.61 Da, provavelmente referente a bradicinina. Aquisição por MALDI/TOF no modo linear refletido.



**Figura 11:** Espectro de massa da fração PfTx 4, sendo visível o peptídeo majoritário  $[M+H]^+ = 1358.780$ . A aquisição do espectro foi realizada pela técnica do MALDI/TOF no modo linear refletido.



**Figura 12:** Espectro de massa da fração PfTx 6, pode-se observar um pico majoritário muito intenso com massa monoisotópica de  $[M+H]^+ = 2748.501$ . O espectro foi obtido por MALDI/TOF no modo linear refletido.



**Figura 13:** Espectro de massa da fração PfTx 10, obtido por MALDI/TOF no modo linear refletido, mostrando as formas protonadas do peptídeo, com hidrogênio e seus aductos com sódio e potássio respectivamente.

Um resumo das massas encontradas e de seus respectivos tempos de retenção no CLAE está mostrado na tabela 4.

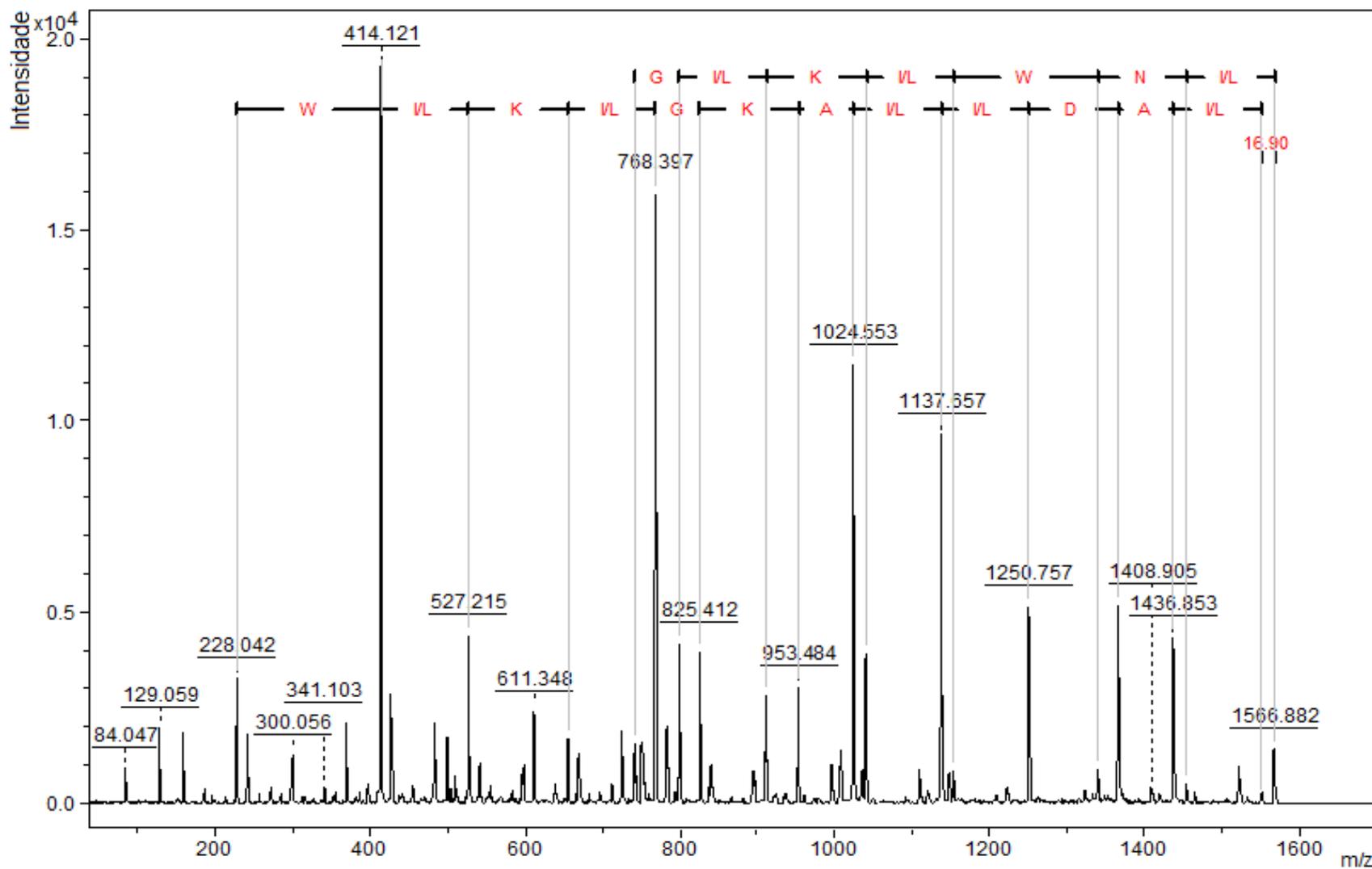
**Tabela 4:** Análise das massas moleculares majoritárias da peçonha de *Paracharergus fraternus*.

Fração	Tempo de Retenção (min)	[M+H] <sup>+</sup>
PfTx 2	42,5	1131,71; 1300,86; 1448,93
PfTx 3	44,5	1055,61; 1479,86; 1358,78
PfTx 4	46,3	1358,78
PfTx 6	53,0	2748,50
PfTx 10	61,0	1567,99

#### 4.5 Sequenciamento do peptídeo majoritário da PfTx 10

Uma vez que apenas a Pftx 10 apresentou atividade significativa no teste de analgesia, a etapa de sequenciamento e alinhamento se restringiu ao peptídeo majoritário presente nesta fração.

A sequência *de novo* do peptídeo majoritário presente na fração PfTx 10 foi deduzida pela análise de espectros de massa obtidos por MALDI-MS/MS do íon 1566.99 [M+H]<sup>+</sup> obtidos por fragmentação a laser, utilizando espectômetro de massa de alta resolução (UltraTOF - Bruker Daltonics, Billerica, USA). As análises da fragmentação deste íon possibilitaram a obtenção da sequência completa de aminoácidos do peptídeo mantendo as ambiguidades. A sequência foi confirmada por meio da análise das duas series de íons, a **-b** e a **-y**. Por fim resultou-se na sequência: Ile/Leu- Asn- Trip-Ile/Leu-Lys/Gln-Ile/Leu-Gly-Lys/Gln-Ala-Ile/Leu-Ile/Leu- Asp-Ala-Ile/Leu – NH<sub>2</sub> (Figura 14).



**Figura 14:** Sequenciamento *de novo* do peptídeo majoritário da fração PfTx 10. Realizado no MALDI-TOF/TOF no método LIFT.

#### 4.6 Análise da sequência primária

Após a obtenção da sequência parcial por espectrometria de massa, que resultou na seguinte sequência I/L N W I/L K/Q I/L G K/Q A I/L I/L D A I/L – NH<sub>2</sub>, optou-se por compará-la na base de dados *online* <http://www.ebi.ac.uk/Tools/MPsrch>. Após esta análise pode-se evidenciar que se trata de um mastoparano conhecido, cujas ambiguidades foram sanadas por homologia de sequências e massas moleculares. Logo, concluiu-se que a sequência do peptídeo é idêntica ao mastoparano da vespa social *Agelaia pallipes*, denominado Agelaia-MP, descrito por Mendes e colaboradores em 2004 (Figura 15).

	10	20
	..... ..... ..... ..... .	
<i>Parachatergus fraternus</i>	INWLKLGKAIIDAL	
<i>Agelaia p. pallipes</i>	INWLKLGKAIIDAL--100%	
<i>Protopolybia exigua</i>	INWLKLGKAIIDAL--92.9%	
<i>Polybia paulista</i>	INWLKLGKMVIDAL--85.7%	
<i>P. paulista</i>	IDWLKLGKMVDVL--64.3%	

**Figura 15:** Sequências de mastoparanos isolados de vespas sociais alinhadas pela ferramenta de múltiplos alinhamentos Clustal W disponível no softwareBioedit v.7.0.4.1.

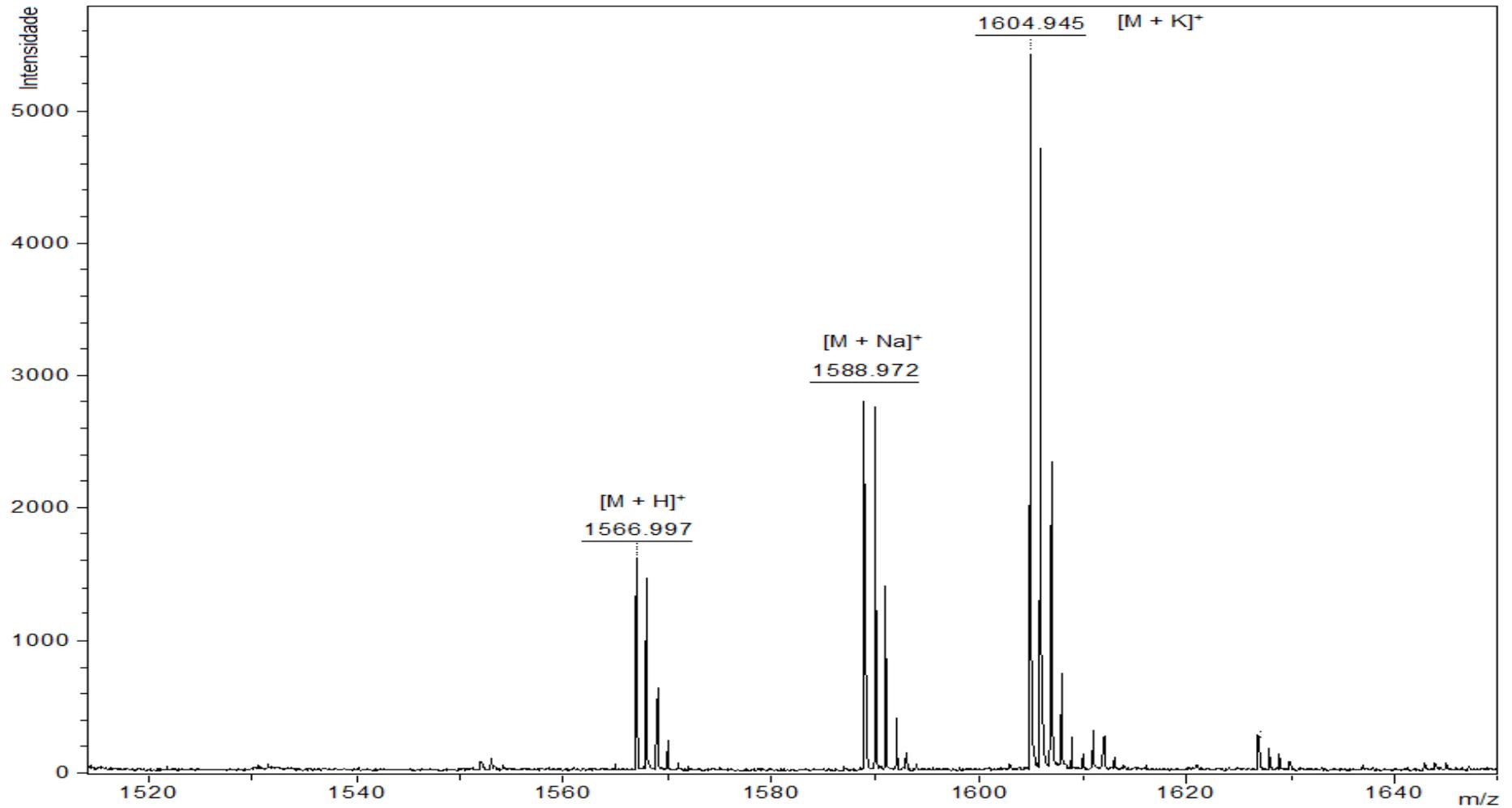
#### 4.7 Peptídeo Sintético

Após a obtenção da sequência por espectrometria de massa e homologia, optou-se por sintetizar o peptídeo com a sequência similar ao peptídeo identificado, evitando o uso de mais material biológico. A síntese foi realizada pela empresa AminoTech® Desenvolvimento e Tecnologia Ltda.

A massa molecular do mastoparano sintetizado foi aferida por MALDI-TOF MS e o sequenciamento *de novo* foi realizado por MALDI- TOF MS/MS, no Laboratório de Espectrometria de Massa da EMBRAPA Cenargen. De acordo com os espectros

demonstrados a seguir ficou comprovado que o peptídeo sintetizado apresentava alto grau de pureza (99%) e que a síntese estava correta.

O espectro de massa revelou três íons sendo o primeiro o peptídeo protonado  $[M+H]^+ = 1566.997$ , o segundo o aducto com sódio  $[M+Na]^+ = 1588.972$  e o terceiro o aducto com potássio  $[M+K]^+ = 1604.945$  (Figura 16). O sequenciamento do peptídeo sintético foi realizado da mesma maneira que o peptídeo natural e apresentou a mesma sequência de aminoácido confirmando a identidade do peptídeo (Figura 17).



**Figura 16:** Espectro de massa MALDI – MS do peptídeo sintetizado idêntico ao natural pela empresa AminoTech®, demonstrando a pureza do peptídeo  $[M + H]^+ = 1566,99$  m/z. A presença de mais de uma massa se deve ao fato de possuir um aducto com sódio e um com potássio.

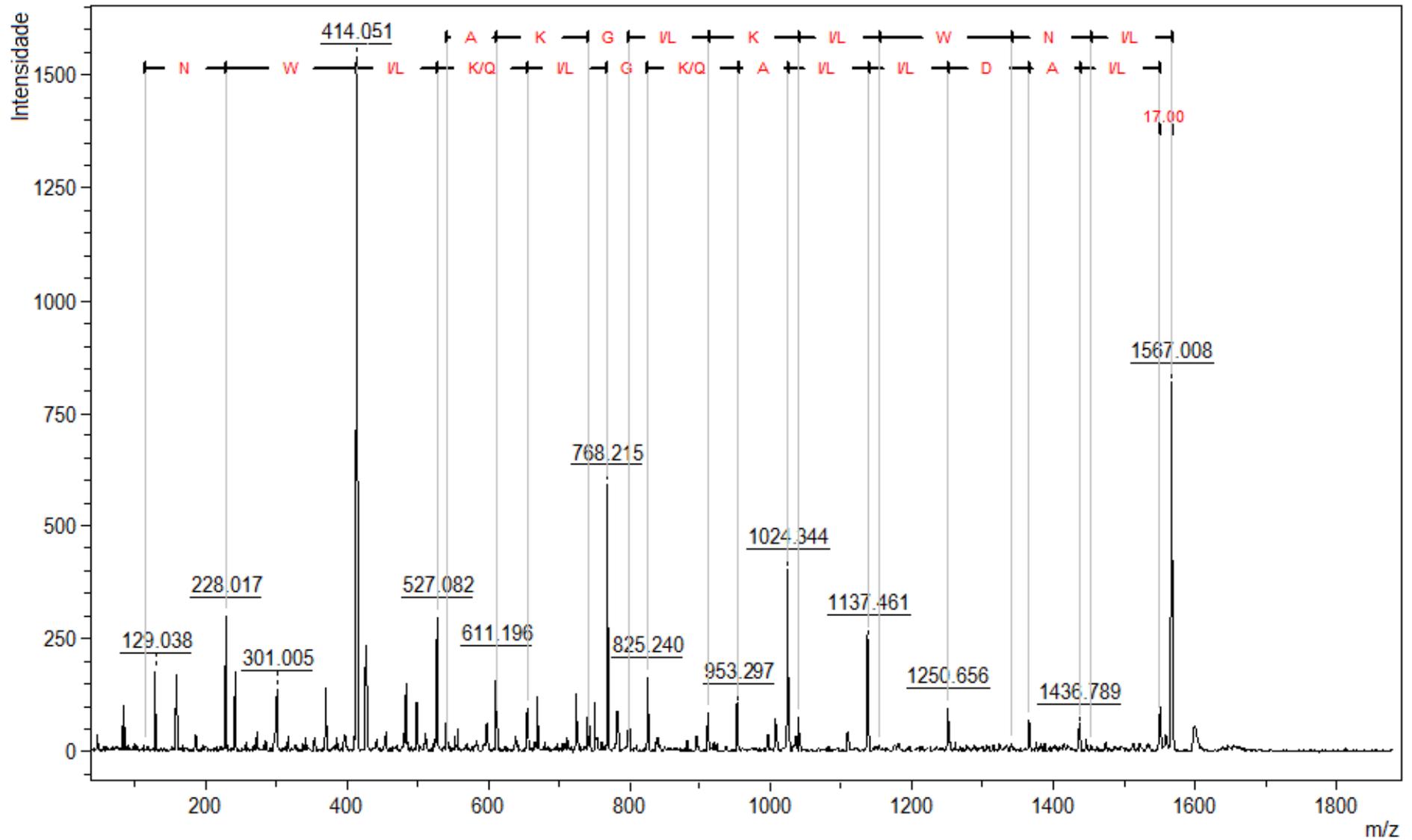
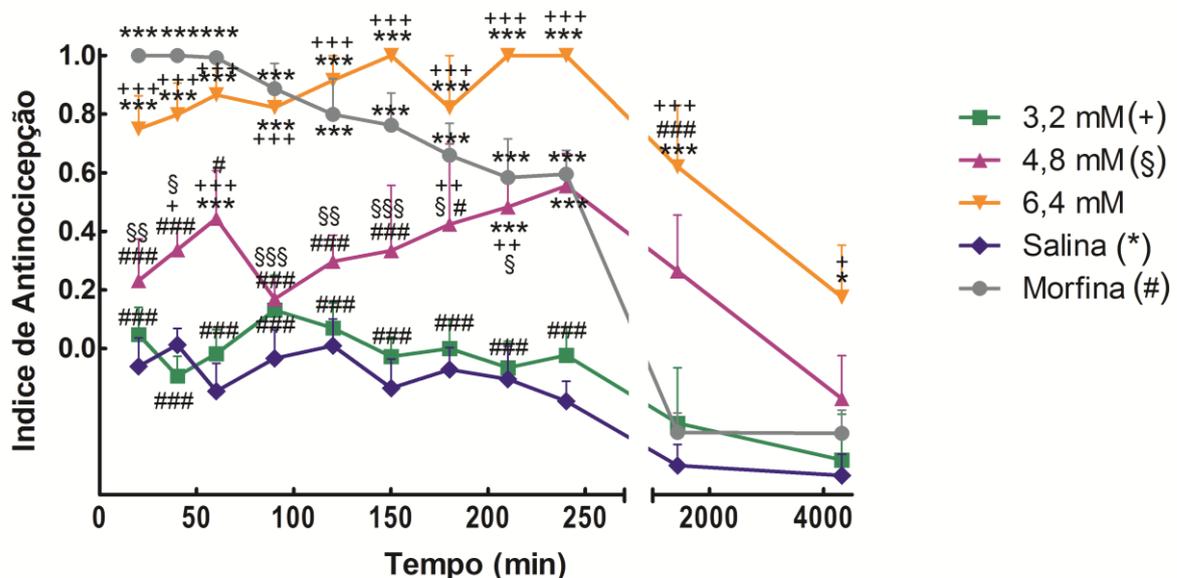


Figura 17: Espectro MS/MS do peptídeo sintetizado pela AminoTech® idêntico ao natural, comprovando a sequência.

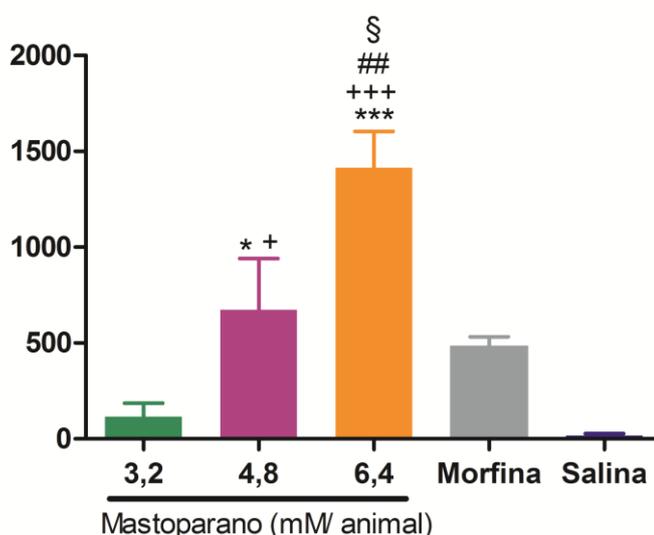
#### 4.8 Efeito antinociceptivo do peptídeo sintético em modelos de indução de dor térmica (placa quente e retirada da cauda) em camundongos

O Mastoparano sintetizado, quando injetado por via i.c.v., induziu um potente efeito antinociceptivo de maneira dose-dependente, em camundongos ensaiados no teste de antinociceção por estímulo térmico da placa quente (*hot plate*). Diferenças significativas foram observadas nos resultados do efeito do tratamento [ $F_{(4,29)} = 56.02$ ;  $p < 0.0001$ ], tempo [ $F_{(10,29)} = 23.69$ ;  $p < 0.0001$ ] e na interação do tratamento-versus-tempo [ $F_{(40,290)} = 4.71$ ;  $p < 0.0001$ ]. É possível observar (Figura 18) diferenças significativas até três dias após a administração do peptídeo i.c.v. na concentração de 6,4 mM em relação à salina e à menor concentração. O pós-teste de Bonferroni revelou diferenças significativas em relação a salina e a concentração de 3,2 mM com  $p < 0.001$  nas doses de 4,8 mM e 6,4 mM durante as primeiras 24 horas em todos os tempos avaliados.



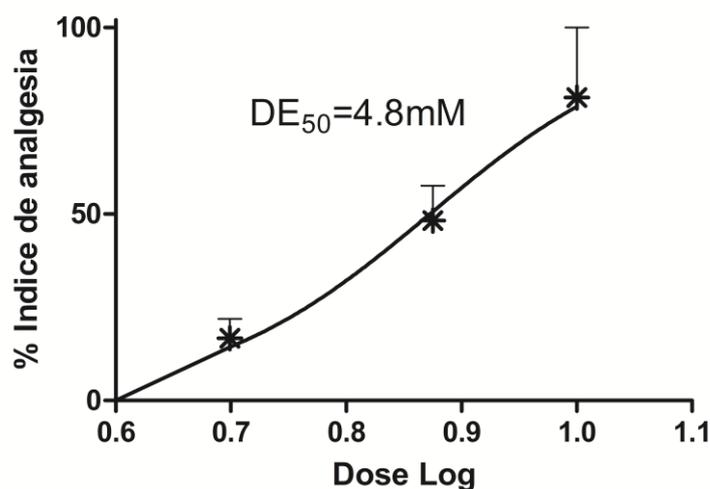
**Figura 18:** Índice de antinociceção das latências de escape da placa quente após injeção i.c.v. do Mastoparano sintético em camundongos. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni. \* Diferenças significativas em relação à salina. \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação a morfina. + Diferenças significativas em relação a dose 3.2 mM. § Diferenças significativas em relação a dose 4.8 mM.

A análise da área abaixo da curva do índice de antinocicepção do teste da placa quente mostra um aumento do efeito dependente da dose administrada evidenciando a característica dose-resposta apresentada pelo peptídeo. A análise estatística one-way ANOVA mostrou valores significativamente distintos com relação a maior dose de peptídeo injetada e todos os outros tratamentos, comprovando o potente efeito antinociceptivo nesta dose. Houve também diferença significativa entre a dose de 4.8 mM e a de 6.4 mM com a menor dose do peptídeo ( $p < 0.05$ , e  $p < 0.001$  respectivamente) (Figura 19).



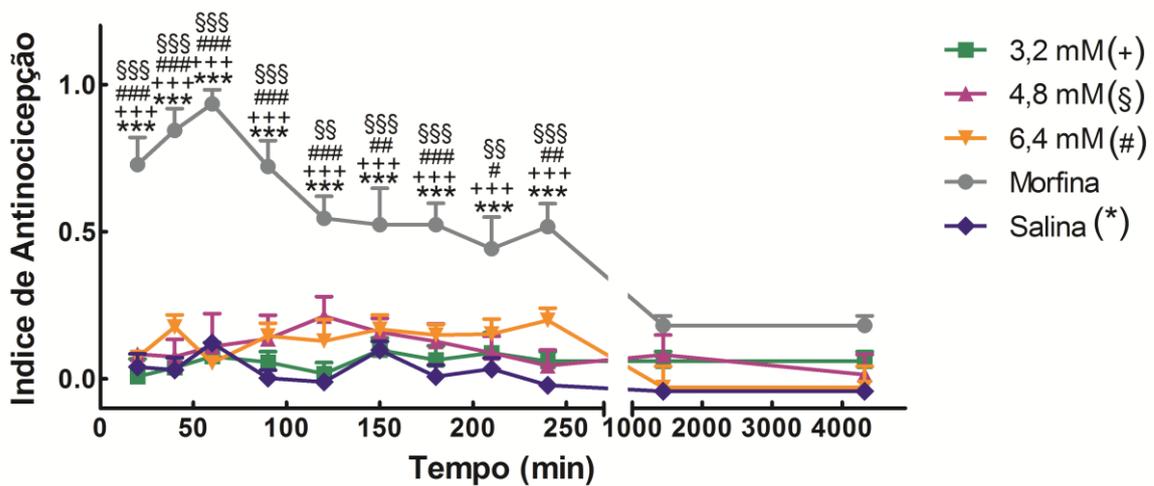
**Figura 19:** Área abaixo da curva do Índice de antinocicepção da placa quente (*hot-plate*). Os dados foram submetidos ao teste estatístico Anova seguido pelo teste de Tukey. \* Diferenças significativas em relação à salina. \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação a morfina. + Diferenças significativas em relação a dose 3.2 mM. § Diferenças significativas em relação a dose 4.8 mM.

O uso de três doses possibilitou a construção de uma curva dose-resposta no teste da placa quente onde foi possível observar que a concentração do peptídeo necessária para um aumento de 50% no índice de analgesia é de 4.8mM (IC 95% = 6.29 a 8.83) (Figura 20).



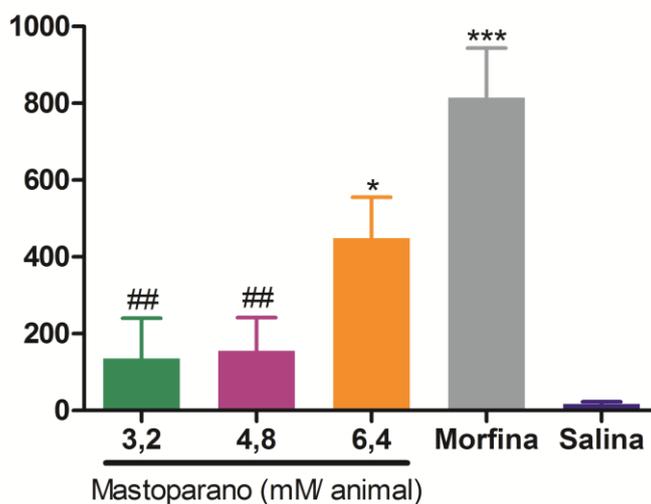
**Figura 20:**  $DE_{50}$  do Mastoparano sintético testado via i.c.v. em camundongos (IC 95%= 6.29 a 8.83).

Os animais ensaiados no teste da retirada de cauda (*tail-flick*) não apresentaram efeito antinociceptivo significativo em relação ao peptídeo embora tenham sido observadas diferenças significativas no efeito da morfina. Two-way ANOVA apresentou significância do tratamento [ $F(4,25) = 44.759$ ;  $p < 0.0001$ ], tempo [ $F(10,25) = 8.089$ ;  $p < 0.0001$ ] e na interação tratamento-versus-tempo [ $F(40,250) = 5.329$ ;  $p < 0.001$ ]. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre as doses do peptídeo testadas e a salina, as diferenças significativas observadas na análise do Bonferroni foram referentes somente à morfina em relação a salina e as outras doses (Figura 21). A morfina mostrou-se significativamente diferente de todos os outros tratamentos durante quatro horas de ensaio, com  $p < 0.05$  no tempo de 210 minutos em relação à dose 6.4 mM e  $p < 0.001$  nos tempos 150 e 240 min relacionada a mesma dose. Já entre a dose de 4.8 mM foi possível observar um  $p < 0.001$  em dois tempos 120 e 210 min.



**Figura 21:** Índice de antinociceção do teste de retirada da cauda, após a administração do mastoparano via i.c.v. Os dados foram submetidos ao teste Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni. \* Diferenças significativas em relação à salina.\*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação a dose 6.4. + Diferenças significativas em relação a dose 3.2 mM. § Diferenças significativas em relação a dose 4.8 mM.

Apesar de não se mostrar visível no índice de antinociceção da retirada de cauda, a área abaixo da curva desse teste revelou um aumento da resposta dose dependente (Figura 22). A análise estatística mostrou uma diferença significativa entre a maior dose e a salina, com  $p < 0.05$ , mostrando o efeito duradouro do mastoparano. O pós-teste de Tukey revelou diferenças significativas com  $p < 0.001$  entre os tratamentos 3.2 e 4.8 mM em relação à morfina, entre a salina e a dose de 6.4 mM com  $p < 0.05$  e entre a salina e a morfina com  $p < 0.001$ .



**Figura 22:** Área abaixo da curva do teste de retirada da cauda. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Anova seguido pelo teste de Tukey. \* Diferenças significativas em relação à salina. \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \* =  $p < 0.05$ . # Diferenças significativas em relação a morfina.

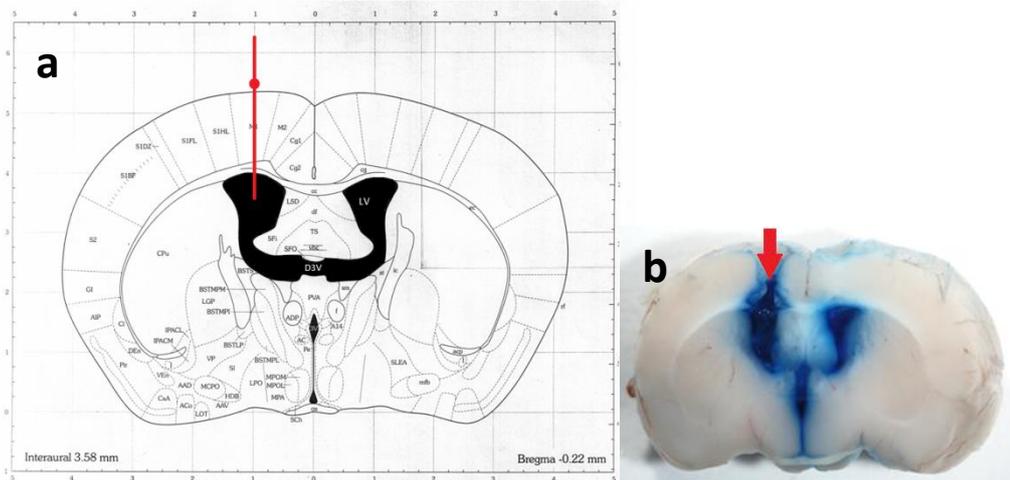
#### 4.9 Verificação da cânula guia

Para a administração dos compostos o procedimento de injeção i.c.v. foi utilizado. Neste procedimento, uma cânula guia é implantada 4-6 dias antes da injeção dos compostos. Desta forma, pode-se verificar a posteriori o local exato da injeção, de maneira a avaliar apenas os animais que receberam a injeção correta.

A posição da cânula-guia e do local de injeção foram verificados em todos os animais experimentados. A marcação em azul da Figura 23 indica os ventrículos laterais segundo a Atlas de Franklin & Paxinos (1997).

Apenas àqueles que apresentaram o correto posicionamento da cânula guia, verificada pela coloração azul em ambos os ventrículos, foram considerados como válidos para a análise estatística.

Após a eutanásia dos animais, foi injetado 0,01mL do corante azul de metileno na cânula guia implantada conforme demonstrado em vermelho na figura a esquerda.



**Figura 23:** Na Figura 22a está indicado em vermelho a posição da cânula guia no ventrículo lateral esquerdo segundo o atlas de Franklin & Paxinos (1997), e em b a marcação em azul de uma fatia do encéfalo do animal utilizado no experimento, a seta vermelha indica a inserção da cânula.

## 5 Discussão

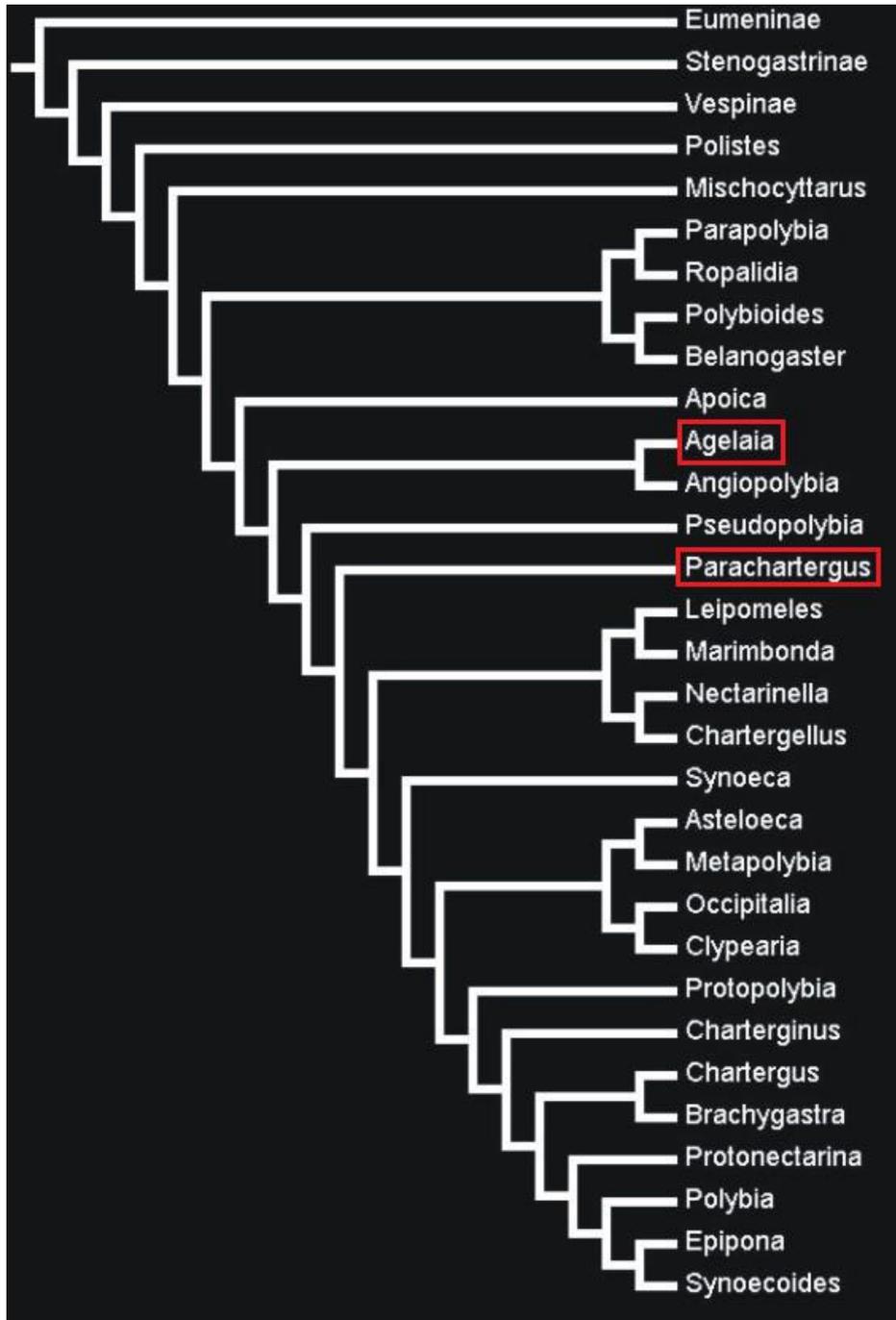
Há no mundo uma extensa variedade de animais peçonhentos e venenosos capazes de produzir toxinas ou apenas armazenar toxinas derivadas de outros organismos em estruturas anatômicas especializadas. Esses animais vivem em uma “guerra evolucionista tecnológica” com suas presas e predadores onde o vencedor permanece vivo por mais tempo. Isto não ocorre de um dia para o outro, mas demanda milhões de anos e se perpetua, pois enquanto alguns desenvolvem venenos mais potentes, outros modificam suas estruturas de maneira que a toxina não faça mais efeito (Mortari *et al*, 2007; Mebs, 2000).

A partir da observação do comportamento desses animais na natureza e dos efeitos dessas toxinas em outros animais, a comunidade científica começou a dar crédito e importância às toxinas e passou a estudá-las com intuito de desenvolver novas ferramentas biotecnológicas, bem como novos fármacos para diversas patologias humanas como hipertensão e ansiedade, bem como o desenvolvimento de novas drogas analgésicas (Mortari *et al*, 2007; Xu *et al*, 2006).

As vespas ou marimbondos, assim como as abelhas e as formigas, são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera. A maioria das espécies descritas nessa ordem são vespas, cerca de 130.000, sendo distribuídas em três grandes famílias: Vespidae, Pompilidae e Sphecidae. Estes insetos possuem grande importância ambiental seja como polinizadores e espalhadores de sementes ou como agentes de controle biológico contra lepidópteros e coleópteros (Gillot, 1995; Gallo *et al*, 2002; Ribeiro Junior, 2008)

A família Vespidae apresenta seis subfamílias das quais três são compostas por vespas solitárias (Eumeninae, Euparaginae e Masarinae) e as outras (Vespinae, Polistinae e Stenogastrinae) comportam as espécies sociais. A vespa *Parachartergus fraternus* está incluída na subfamília Polistinae, esta subfamília se distribui mundialmente, porém sua maior concentração está em regiões tropicais, principalmente no Brasil, onde se encontram 26 gêneros e mais de 900 espécies (Mateus, 2005; Ribeiro Junior, 2008).

Por apresentar muitas espécies e uma ampla distribuição geográfica a subfamília Polistinae é dividida em quatro tribos: Polistini, Mischocyttarini, Ropallidiini e Epiponini (Mateus, 2005). O gênero *Parachartergus* está enquadrado na última tribo mencionada, assim como as vespas do gênero *Agelaia*, o que poderia explicar a existência de peptídeos comuns em suas peçonhas, visto sua proximidade filogenética (Figura 24).



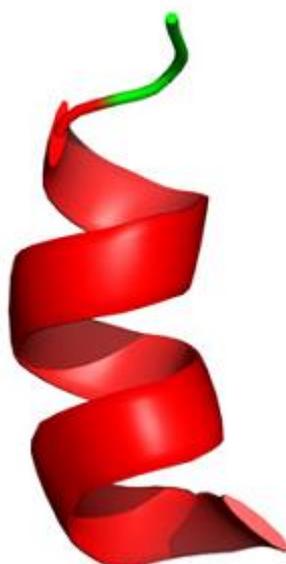
**Figura 24:** Árvore filogenética da Família Polistinae (Wenzel e Carpenter, 1994).

Apesar das vespas da espécie *Parachartergus fraternus* serem agressivas, com ninhos de difícil acesso, pois estes se encontram sempre altos e bem aderidos à vegetação estando por vezes enrolados nos galhos, e possuírem tendência a abandonar o ninho mediante as interferências (Mateus, 2005), estas são encontradas facilmente na região de cerrado, principalmente durante o verão. Além disso, o comportamento de borrifar a peçonha em vez de injetá-la no agressor torna a coleta do material biológico mais fácil.

Quanto à peçonha, a vespa *Parachartergus fraternus* apresenta uma riqueza considerável de compostos de baixa massa molecular, principalmente os peptídeos que são eluídos após 40 minutos do início do procedimento cromatográfico. Foram observadas onze frações de compostos peptídicos separadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Outros autores realizaram a separação de compostos com a peçonha bruta gerando perfis cromatográficos muito similares, mesmo realizando a separação com a peçonha bruta, ou seja, também com os compostos de alta massa molecular (Rocha *et al*, 2010; Souza *et al*, 2009; Mendes *et al* 2005; Mendes *et al* 2004). Souza e colaboradores (2009) fizeram um estudo com a peçonha da vespa social *Polybia paulista*, a qual apresentou um total de 13 frações, sendo as duas primeiras ricas em aminas biogênicas e em neurotransmissores. Para esta vespa as últimas frações 11 e 13 eluídas em aproximadamente 35 e 40 minutos, respectivamente, são constituídas por mastoparanos.

O perfil cromatográfico da peçonha da vespa *Agelaia pallipes pallipes*, apesar da semelhança de compostos com a *Parachartergus fraternus* possui apenas 7 frações cromatográficas, sendo a última com tempo de retenção de aproximadamente 40 minutos representada pelo mastoparano *Agelaia MP – I* (Mendes *et al*, 2004). Os mastoparanos isolados em geral apresentam tempo de retenção entre 30 e 40 minutos (Rocha *et al*, 2010; Souza *et al*, 2009; Mendes *et al*, 2004). Apesar dos tempos de retenção serem bastante distintos entre os mastoparanos encontrados na literatura e o mastoparano descrito neste trabalho, e ressaltando que a metodologia empregada foi diferente, é possível observar que são compostos hidrofóbicos similares, pois eluem com porcentagens de acetonitrila próximas a 60%.

A fração cromatográfica PfTx 10 isolada da vespa social *Parachartergus fraternus* apresentou efeito antinociceptivo quando injetado via i.c.v. em camundongos, efeito observado aos 50 e 60 min após a injeção. O peptídeo majoritário dessa fração foi sequenciado e identificado como um mastoparano, uma molécula muito bem descrita nas peçonhas de vespas. O sequenciamento de novo foi capaz de identificar parcialmente a composição dos aminoácidos mantendo algumas ambiguidades, que foram resolvidas por homologia, resultando na seguinte sequência: INWLKLGKAIIDAL – NH<sub>2</sub>. Após análise comparativa concluiu-se que é o mesmo mastoparano encontrado primeiramente na vespa *Agelaia pallipes* e conhecido como Agelaia – MP I. Testes biológicos demonstraram que o mastoparano tem atividade de degranulação de mastócitos e não apresenta efeitos antimicrobianos ou quimiotáticos (Mendes *et al*, 2004). Em um recente artigo, Batista-Saidemmmberg e colaboradores (2012) demonstraram que este mastoparano é capaz de aumentar a secreção de insulina pelas células pancreáticas de camundongo via modulação de proteína G sem causar efeitos citolíticos nestas células, além de fazer a modelagem da estrutura secundária tridimensional do peptídeo, conforme demonstrado na figura 25.



**Figura 25:** Estrutura secundária tridimensional do mastoparano isolado da peçonha da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* denominado Agelaia-MP I (Batista-Saidemmmberg *et al*, 2012).

O Mastoparano, um peptídeo cuja principal função é de degranular mastócitos, foi primeiramente descrito na peçonha da vespa social *Vespula flaviceps lewisii* em 1979 por Hirai e colaboradores. Desde então, foram inúmeras as descobertas sobre as funções dessa molécula *in vivo* e *in vitro*, sabe-se que eles também podem atuar como antimicrobianos, antitumorais, citolíticos e moduladores de proteína G. Estes peptídeos são versáteis, porém pouco seletivos visto que atuam em diversos alvos celulares (Saidemberg, 2011; Hirai *et al*, 1979; Higashijima *et al*, 1988).

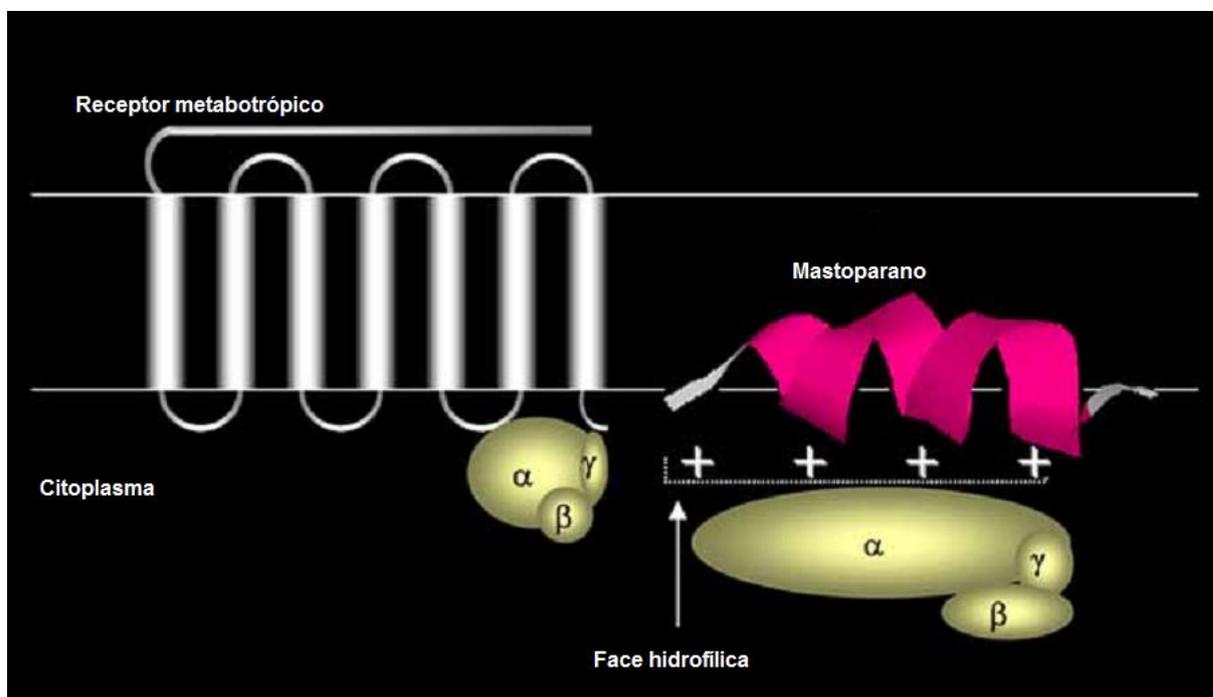
Os dados do presente trabalho demonstram que o mastoparano apresenta um efeito antinociceptivo quando injetado diretamente no SNC de camundongos, no teste da placa quente. Além disso, seu efeito foi dose-dependente, e a maior dose demonstrou efeito antinociceptivo prolongado até três dias após a injeção.

Até o presente momento foram identificados poucos compostos antinociceptivos da peçonha de vespas, sendo descritos apenas dois. A Thr6-BK (RPPGFTPFR), isolada da *Polybia occidentalis*, foi descrita como antinociceptiva por Mortari e colaboradores em 2007, apresentando um potente efeito quando injetado via i.c.v. em ratos. O outro composto foi isolado da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, denominado Palipina, possui, uma sequência amidada com 22 resíduos de aminoácidos (SIKKHKCIALLKRRGGSKLPFC-NH<sub>2</sub>), apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório quando injetado perifericamente em camundongos (Baptista-Saidemberg, 2011).

O presente trabalho descreve pela primeira vez o efeito antinociceptivo de um mastoparano. A ação dos mastoparanos no Sistema Nervoso Central de camundongos foi descrita pela primeira vez por Blazquez e Garzon em 1994. Eles demonstraram que o mastoparano, isolado da *Vespula lewisii*, pode atuar interagindo em receptores opióides ligados a proteína G e este efeito permanece nove dias após a injeção, esta interação diminuiu a ação analgésica dos opióides (Blazquez e Garzon, 1994).

Mais recentemente, Jones e Howl (2006) descobriram que os mastoparanos são capazes de ativar a resposta celular mediada por proteína G, ativando-a de maneira semelhante a um receptor metabotrópico. Segundo estes autores, os

mastoparanos se posicionam na membrana celular na posição horizontal com sua face hidrofílica voltada para o meio intracelular, se ligando a proteína G, predominantemente Gi ou Go, catalisando a troca GDP/GTP simulando o receptor ativado (Jones e Howl, 2006) conforme ilustrado na figura 26.



**Figura 26:** Representação do mastoparano na membrana citoplasmática mimetizando um receptor metabotrópico (Jones e Howl, 2006 modificado).

Interessantemente todos os receptores opióides são do tipo metabotrópico, ou seja, são acoplados a proteína G, do tipo Gi e Go. Quando estimulados pelos seus ligantes ocorre a inibição da enzima adenilato ciclase, reduzindo o nível de adenosil monofosfato de sódio intracelular o que resulta no fechamento de canais de cálcio voltagem dependentes nas terminações sinápticas, diminuindo a liberação de neurotransmissores e conseqüentemente, a ativação dos receptores, bloqueando parcialmente a transmissão do estímulo doloroso (Dietis *et al*, 2011; Martins, 2012; Mizoguchi *et al*, 2012).

Considerando isto e a capacidade dos mastoparanos de ativarem as proteínas G, pode-se inferir um possível mecanismo de ação para o mastoparano isolado da *Parachartergus fraternus*. Provavelmente ao ser injetado diretamente no

sistema nervoso central o mastoparano Agelaia-MP I provoca ativação da proteína G ligada ao sistema opióide endógeno resultando em um potente efeito antinociceptivo.

Diferenças foram observadas entre os dois testes utilizados neste trabalho, pode-se observar que o peptídeo foi mais ativo no teste de placa quente. Esta diferença pode ter sido gerada uma vez que os compostos foram injetados via icv, e o teste de retirada de cauda tem como principal modulador, receptores na medula espinhal. O teste de retirada de cauda tem sido muito utilizado para avaliar fármacos com ação opióide-like, mas prioritariamente por injeção sistêmica (Le Bars *et al*, 2001).

Outro possível mecanismo de ação deste mastoparano, que explicaria os resultados obtidos nos ensaios da retirada da cauda e da placa quente, seria a possibilidade do peptídeo atuar bloqueando a via ascendente da dor. Neste alvo o peptídeo impediria a transmissão do impulso diretamente no tálamo, atuando nos neurônios de segunda ordem e causando inibição pré-sináptica, conseqüentemente impedindo a liberação de neurotransmissores (Mizoguchi *et al*, 2012).

Os mastoparanos além de serem excelentes ferramentas para estudo de receptores ligados a proteína G (Saidenberg, 2011) e de receptores e canais envolvidos na nocicepção (Blazquez e Garzon, 1994) eles também podem atuar promovendo a antinocicepção quando injetado diretamente no SNC.

São necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação relacionados a atividade antinociceptiva do mastoparano que possivelmente pode estar relacionada com a proteína G.

Como visto no perfil cromatográfico da peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* ainda existem muitos compostos de baixa massa molecular a serem estudados nessa peçonha, que tem um grande potencial farmacológico e biotecnológico. Quanto ao mastoparano a partir deste trabalho adicionou-se mais uma função a essa molécula multifuncional, a atividade antinociceptiva, a qual deve ser mais estudada para que possamos conhecer melhor os mecanismos de ação

possibilitando no futuro o desenvolvimento de uma nova opção terapêutica para a dor.

## 6 Conclusão

- ✓ A peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus* é rica em compostos bioativos de baixa massa molecular, com atividade direta no SNC.
  
- ✓ A fração com compostos de baixa massa molecular PfTx 10 mostrou-se ativa contra a nocicepção em camundongos no modelo de indução de dor por estímulos térmicos – *tail flick*.
  
- ✓ A atividade analgésica descrita é inédita para essa classe de moléculas mastoparano, uma molécula com múltiplas ações em mamíferos.
  
- ✓ O Mastoparano (INWLKLGKAIIDAL) apresentou um potente efeito antinociceptivo quando injetado via i.c.v. em camundongos, nos testes *hot plate* e *tail-flick*.
  
- ✓ O efeito antinociceptivo induzido pelo mastoparano provavelmente é causado pela inativação da via ascendente, explicando assim a atividade exacerbada do peptídeo no bioensaio do *hotplate*.

## 7 Referências

- Agostinho, C. e Camacho, M. Uso de psicofármacos na gestão da dor. 2009
- Argiolas, A. e Pisano, J. J. Facilitation for phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. **J Biol. Chem.** Washington, 258(22):13697-13702, 1983.
- Argiolas, A. e Pisano, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and cabrolin, from venom of the european hornet, *Vespa cabro*. **J. Biol. Chem.** Washington, 59(16):101-106, 1984a.
- Argiolas, A. e Pisano, J. J. Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. **J. Biol. Chem.** Washington, 260(3):1437-1444, 1984b.
- Arrowsmith, J. A decade of change. **Nature Reviews**. V.11 Macmillan. 2012
- Baptista-Saidemberg N. B.; Saidemberg, D. M.; Souza, B. M.; Cesar-Tognoli, L. M. M.; Ferreira, V. M. R.; Mendes, M. A.; Cabrera, M. P. S.; Ruggiero Neto, J.; Palma, M. S. Protonectin (1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, 2010.
- Baptista-Saidemberg, N. B. Análise peptidômica dos venenos de vespas sociais neotropicais. 2001. 138f. Tese (Doutorado em Biologia celular e Molecular). Rio Claro, SP. 2011.
- Baron, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective. **Nat Clin Pract Neurol**, v.2, n.2, p.95-106, fev. 2006.
- Barreto *et al.* Avaliação de dor e do perfil epidemiológico de pacientes atendidos no pronto-socorro de um hospital universitário. **Rev Dor**. São Paulo, jul-set;13(3):213-9, 2012.
- Barros, N. Manejo da dor no Brasil – Ação decisiva da SBED. **Rev. Dor**, v.6 (4): 645. 2005.
- Basov, I.; Kononenko, O.; Watanabe, H.; Kuntic, V.; Sarkinsyan, D.; Taqi, M. M.; Hussain, M. Z.; Nyberg, F. Yakovleva, T.; Bakalkin, G. The endogenous opioid system in human alcoholics: molecular adaptations in brain areas involved in cognitive control of addiction. **Addiction Biology**, 18, 161–169. 2009
- Beleboni, R.; Pizzo, A. B.; Fontana, A. C.; Carolino, O. G. R.; Coutinho-Netto, J.; Dos Santos, W. F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. **Eur J Pharmacol** 493(1-3):1-17, 2004.
- Bennett, G. J. Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? **Proc. Nalt. Acad. Sci Usa**: 967737-967738. 1999.

- Blazquez, P. S. e Garzon, J. Mastoparan reduces the supraspinal analgesia mediated by IX/6-opioid receptors in mice. **European Journal of Pharmacology**. v.258 p.159-162. 1994.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Painel internacional de avaliação da segurança da dipirona; 2001.
- Cassola, A. C.; Jaffe, H.; Fales; H. M.; Castro, A. S.; Magnoli, F.; Ci-Polla-Neto, J. Omega-phoetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Pflugers Arch**. v. 436, 545–552, 1998.
- Cerovsk, V.; Pohl, J.; Yang, Z.; Naseer, A.; Attygalle, A. Identification of three novel peptides isolated from the venom of the neotropical social wasp *Polistes major major*. **J. Pept. Sci.** 13: 445–450. 2007.
- Chen, Y. S; Yao, C. H.; Chen, T. H., *et al.* Effect of acupuncture stimulation on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers. **Am J Chin Med**. 29, 377: 385. 2001.
- Chen, J.; Feng, X.; Shi, J.; Tan, Z.; Bai, Z. The anti-nociceptive effect of BmK AS , a scorpion active polypeptide , and the possible mechanism on specifically modulating voltage-gated Na + currents in primary afferent neurons. **Peptides** 27, 2182-2192. 2006.
- Chimello, J.T. e Neto, D. A. Um outro lado da dor. **Rev. Dor**: 5(4): 434-437. 2004
- Cohen, M.; Quinter, J.; Buchanan, D.; Is Chronic Pain a Disease? **Pain Medicine**. 2013.
- Coimbra, A. A dor como sintoma e como doença: na progressão dos seus mecanismos determinantes. Fundação Calouste Goulbekian. 1995.
- Conlon J. M. Bradykinin and its receptors in non-mamalian vertebrates. Regulatory peptides. V 79, p.71-81, 1999.
- Couto, L. B.; Corrêa, F. M. A.; Pelá, I. R. Brain sites involved in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. **Br J Pharmacol**. 125: 1578-1584. 1998.
- Couto, L. L.; Dos Anjos, L. C.; Araujo, M. A. F.; Mourão, C. A.; Schwartz, C. A.; Ferreira, L. B.; Mortari, M. R. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, p. 292, 2012.
- Cordàs A.; Michl H. Isolation and structure of a hemolytic polypeptide from the defensive secretion of european *Bombina* species. **Monatsh. Chem**. 101:182-9, 1970.
- Cunha. A. O. S; Mortari, M. R.; Oliveira, L.; Carolino, R. O.G.; Coutinho-Netto, C.;

- Santos, W. F. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 141 50 – 5. 2005.
- Dal Ponte, S. T.; Machado, A.; Dutra, A. G.; Cardoso, J.; Lima, R. Dor como queixa principal no serviço de pronto-socorro do hospital municipal de São Pedro do Sul. **Rev. Dor**, v.9 (4): 1345-1349. 2008.
- Dias, N. B. Análise proteômica do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* (Hymenoptera: Vespidae). 2009. 67f. Rio Claro, SP. 2009.
- Dickenson, A. H. Central acute pain mechanisms. **Ann Med**. v.27 p.223-227. 1995.
- Dietis, N.; Rowbotham, D. J.; Lambert, D. G. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? **British Journal of Anaesthesia**. 107 (1): 8–18. 2011.
- Dohtsu, K.; Okumura, K.; Palma, M. S.; Nakajima T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera – Vespidae). **Natural Toxins**, New York, 1:271-6, 1993.
- Duarte, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Rev Bras Anesthesiol**. 55: 1: 135 – 146, 2005.
- Fedosov, A. E.; Moshkovskii, S. A.; Kuznetsova, K. G.; Oliveira, B. M. Conotoxins: From the biodiversity of gastropods to new drugs. **Biomedical Chemistry**. v.6 p.107-122. 2012.
- Fletcher, J.I.; Smith, R.; O’ Donghue, S.I.; Nilges, M.; Connor, M.; Howden, M. E.; Christie, M. J.; King, G. F. The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin- HV1, from the venom of an Australian funnel web spider, **Nat. Struct. Biol**. v. 4, 559–566, 1997.
- Flores, M. P.; Castro, A. P. C. R.; Nascimento, J. S. Analgésicos Tópicos. **Rev Bras Anesthesiol**. 62: 2: 244-252. 2012.
- Fontana, A.C., Guizzo, R., de Oliveira, R., Belebani, R., Meirelles e Silva, A.R., Coimbra, N.C., Amara, S.G., dos Santos, W.F. & Coutinho-Netto, J. Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *Br J Pharmacol* 139(7): 1297-309. 2003.
- Forni, J. E. N. e Jalikhian, W. Dor do crescimento. **Rev Dor**. São Paulo, jul-set;12(3):261-4, 2011.
- Franklin, K. B. J. e Paxinos, G. The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates. Academic Press. 1997.
- Gallo, D. et al. **Entomologia agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002. 920p.

Gillott, C. (ed.) Entomology. **New York, Plenum Press**, 798p. 1995.

Gobbo, M.; Biondi, L.; Filira, F.; Rocchi, R. Piek, T. Cyclic analogues of wasp kinins from *Vespa analis* and *Vespa tropica*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 45: 282–289. doi: 10.1111/j.1399-3011.1995.tb01490.x. 1995.

Grishin, E. V.; Savchenko, G. A.; Vassilevski, A. A.; Korolkova, Y. V.; Boychuk, Y. A.; Viatchenko-Karpinski, V. Y.; Nadezhdin, K. D.; Arseniev, A. S.; Pluzhnikov, K. A.; Kulyk, V. B.; Voitenko, N. V.; Krishtai, O. O. Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain. **Annals of neurology**, 67(5), 680-3. 2010.

Guatimosim, C.; Romano-Silva, M. A.; Cruz, J. S.; Beirao, P. S.; Kalapthakis, E.; Moraes-Santos, T.; Cordeiro, M. N.; Diniz, C. R.; Gomez, M. V.; Prado, M. A. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **Br. J. Pharmacol.** v. 122, 591–597, 1997.

Hamilton GR, Baskett TF - In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. **Can J Anaesth**, v.47 p.367-374. 2000.

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

Harvey, J. A.; McMaster, S. E.; Romano, A. G. Methylenedioxyamphetamine: neurotoxic effects on serotonergic projections to brainstem nuclei in the rat. **Brain Res.** 619(1-2):1-14, 1993.

Hedenmalm, K.; Spigset, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole). **Eur J Clin Pharmacol.** 2002;58:265-74. 2002

Higashijima T.; Ross E. M. Mapping of the mastoparan-binding site on G proteins: cross-linking of [„251-Tyr3,Cys”]mastoparan to G0. **J. Biol. Chem.** 266:12655-12661, 1991.

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

Higashigima, M.; Sawada, S.; Yamamoto, C. Applicability of Pascal distribution to quantal analysis for non-stationary release of neurotransmitter. **Neurosci Lett.** Jul 31;115(2-3):231-6. 1990.

Hill, R.G. Molecular basis for the perception of pain. **Trends Neurosci.** 7:282 - 92. 2001.

Hirai, Y.; Yasuhara T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. A new mast cell degranulation peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. **Chem Pharm Bull.** Tokyo, 27(8):1942-1944, 1979a.

Hirai Y.; Kuwada, M.; Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). **Chem Pharm Bull** 27:1945-1946, 1979b.

Hirai, Y.; Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. A new mast cell degranulating peptide, Mastoparan-M in the venom of the Hornet *Vespa mandarina*. **Biomed Res**, 2: 447-449, 1981a.

Hirai, Y.; Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. A new mast cell degranulating peptide, polistes mastoparan, in the venom of *Polistes jadwigae*. **Biomed. Res.** 1: 185-187, 1981b.

Ho, C. L.; Hwang, L. L. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. **Biochem J** 274 ( Pt 2):453-6, 1991a.

Ho, C.L.; Chen, W. C.; Lin, Y. L. Structures and biological activities of new wasp

venom peptides isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon**, Elmstford, 36(4):609-17, 1998.

IASP - International Association for the study of pain. Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, pp. 209-214. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org>. 1994.

Ito, K.; Imafuku, S. Nakayama, J. Rhabdomyolysis due to Multiple Wasp Stings. **Case Reports in Dermatological Medicine**. 2012.

Jones, S. e Howl, J. Biological Applications of the Receptor Mimetic Peptide Mastoparan. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, 501-508. 2006.

Jones, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra RS, Hord, AH, Ginsberg B, Preble L. Acute Pain: Mechanisms & Management. St. Louis: Mosby–Year Book. 1992.

Julius, D. e Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413(September), 203-210. 2001.

Kellenberger, S. e Schild, L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. **Physiological reviews**, 82(3), 735-67. 2002.

Kieffer, B. L. e Evans, C. J. Opioid receptors: From binding sites to visible molecules in vivo. **Neuropharmacology**, v.56 p.205–212. 2009.

King, T. P.; Jim, S. Y.; Wittkowski, K.M. Inflammatory Role of Two Venom Components of Yellow Jackets (*Vespula vulgaris*): A Mast Cell Degranulating Peptide Mastoparan and Phospholipase A1. **Int Arch Allergy Immunol**, 131:25–32. 2003.

Konno, K.; Hisada, M.; Naoki, H.; Itagi, Y.; Kaway, N.; Miwa, A.; Yasuhara, T.; Motimoto, Y.; Nakay, Y. Structure and biological activities of eumenine

mastoparan – AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in venom of solitary wasp (*Antenynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**, Elmsford, 38:505-1515, 2000.

Konno, K.; Hisada, M.; Fontana, R.; Lorenzi, C. C. B.; Naoki, H.; Itagaki, Y.; Miwa, A.; Kawai, N.; Nakata, Y.; Yasuhara, T.; Ruggiero, N. J.; Azevedo, W. F.; Palma, M. S.; Nakajima, T. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Bioch Biophys Acta**, Amsterdam, 1550:70-80, 2001.

Konno, K.; Hisada, M.; Naoki, H.; Itagaki, Y.; Fontana, R.; Rangel, M.; Oliveira, J. S.; Dos Santos-Cabrera, M. P.; Ruggiero-Neto, J.; Hide, I.; Nakata, Y.; Yasuhara, T.; Nakajima, T. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. **Peptides**, 27, 11: 2624-2631, 2006.

Kreling, M.; Monteiro, D.; Pimenta, C. Prevalencia de dor crônica em adultos. **Revista Brasileira De Enfermagem**, 59(1), 509-513. 2006.

La, J. L.; Jaiali, S.; Shami, S. A. Morphological studies on crushed sciatic nerve of rabbits with electroacupuncture or diclofenac sodium treatment. **Am J Chin Med**. 33(4), 663: 669. 2005.

Lampe, R. A.; Defeo, P. A.; Davison, M. D.; Young, J.; Herman, J. L.; Spreen, R.C.; Horn, M. B.; Mangano, T. J.; Keith, R. A. Isolation and pharmacological characterization of omega-gammotoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses, **Mol. Pharmacol.** v. 44, p. 451–460, 1993.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden S W (2001). Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.** 53:597-652

Lent, R. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

- Levine J. D., Taiwo, Y. Inflammatory Pain. Em: Wall, P.D., Melzack, R. Textbook of Pain, 3a Ed, Edinburgh, Churchill Livingtone, 45 - 56. 1994.
- Lin, C.; Hou, R. F.; Shyu, C.; Shia, W.; Lin, C.; Tu, W. In vitro activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from animals. **Peptides** v.36 p.114–120. 2011.
- Linhares, M. B. M. e Martinez, F. E. A eficácia da sacarose no alívio de dor em neonatos: revisão sistemática da literatura. **Jornal de Pediatria**, 435-442. 2005.
- Marquez, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. Dor: diagnóstico e tratamento. Vol 1. Ambito Editores. 2004.
- Martin, W. R. Phamacology of opioids. **Pharmacol. Rev.**, 35: 283-353, 1983.
- Martins, R. T.; Almeida, D. B.; Monteiro, F. M. R.; Kowacs, P. A.; Ramina, R. Receptores opioides até o contexto atual. **Rev Dor**. São Paulo 13(1):75-9. 2012.
- Mateus, S. Analise dos comportamentos envolvidos na organização social e no processo de enxameio de *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera, Polistinae, Epiponini). 2005. 160f. Tese (Doutorado em Ciências). Ribeirao Preto, SP. 2005.
- Mebis, D. Toxicity in animals. Trends in evolution ?. **Nature**, 39. 2001
- Mendes, M. A. e Palma, M. S. Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Peptides** v.27 p.2632–2639. 2006.
- Mendes, M. A.; Souza, B. M.; Santos, L. D.; Palma, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes* by high performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, New

Jersey, 181(7), 2004a.

Mendes, M. A.; Souza, B. M.; Marques, M. R.; Palma, M. S. Structural and biological of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, Elmsford, 44:67-74, 2004b.

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

Millan MJ (2002). Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66:3474-555.

Mizoguchi, H.; Watanabe, C.; Sakurada, T.; Sakurada, S. New vistas in opioid control of pain, 2011 <Disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)> Acesso em: nov 2012.

Mogil J. S. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. **Nature Reviews Neuroscience**. v.13 Dez 2012.

Monzani, R.; Crozzoli, L.; Ruvo, M. Acupuncture for Pain Treatment. **The Open Pain Journal**. v.3 p.60-65. 2010.

Mortari, M. R.; Cunha, A. O.; De Oliveira, L.; Vieira, E. B.; Gelfuso, E. A.; Coutinho-Netto, J.; Ferreira, W. S. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 97:289-95, 2005.

Mortari, M. R.; Cunha, A. O.; Ferreira, L. B.; Dos Santos, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol Ther** 114(2):171-83, 2007.

Mortari, M. R. Neurotoxinas: perspectivas para a descoberta de novos analgésicos, **Universitas Ciências da Saúde**. 155-167. 2007.

- Mortari, M. R.; Couto, L. L.; Carneiro, L. A.; Mourao, C. B. F.; Camargo, T. S.; Vargas, J. A. G.; Oliveira, F. N.; Gati, C. D. C.; Schwartz, C. A.; Schwartz, E. F. Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: An aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. **Toxicon** (Oxford), v. 59, p. 163-170, 2012.
- Mortari, M. R. et al. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr-6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **British Journal of Pharmacology**, 860-869. 2007.
- Mundim, N. C. C. Prospecção de bradicininas de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. 2008. 84f. Dissertação ( Mestrado em Biologia Animal). Brasília, DF. 2008.
- Murata, K.; Shinada, T.; Ohfune, Y.; Hisada, M.; Yasuda, A.; Naoki, H.; Nakajima, T. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. **Biol Pharm Bull**, Tokyo, 29(12):2493-2497, 2006
- Murata, K.; Shinada, T.; Ohfune, Y.; Hisada, M.; Yasuda, A.; Naoki, H.; Nakajima, T. Novel mastoparan and protonectin analogs isolated from a solitary wasp, *Orancistrocerus drewseni drewseni*. **Amino Acids** 37:389-394, 2009.
- Nakajima, T.; Uzu, S.; Wakamatsu, K.; Saito, K.; Miyazawa, T.; Yasuhara, T.; Tsukamoto, Y.; Fujino, M. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, New York, 25:115-21, 1986.
- Nazimov, I. V.; Snezhkova, L. G.; Miroshnikov, A. T. Structure and properties of mastoparan II. Na oligopeptide from the venom of *Vespa orientalis* hornet. Proc. 3d **Symp. Chem. Pept.** Prot.: USSR, 1980.
- Newcomb, R.; Szoke, B.; Palma, A.; Wang, G.; Chen, X.; Hopkins, W.; Cong, R.; Miller, J.; Urge, L.; Tarczy-Hornoch, K.; Loo, J. A.; Dooley, D. J.; Nadasdi, L.; Tsien, R. W.; Lemos, J.; Miljanich, G. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*.

**Biochemistry**. v. 37, 15353–15362, 1998.

Oliveira, L.; Cunha, A. O. S.; Mortari, M. R.; Pizzo, A. B.; Miranda, A.; Coimbra, N. C.; Santos, W. F. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaisia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. **Brain Research** v.1031 p.74–81. 2005.

Oliveira, A.; Soares, P. M.; Rodrigues, M. E. D. S.; Patrocínio, M. C. A.; Lima, R. C. D. S. Psicofisiologia da dor : uma revisão bibliográfica, 87-96. 2008.

Ossipov, M. H.; Dussor, G. O.; Porreca, F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* v. 120 p. 3779–3787. 2010.

Palma, M. S.; Dohtsu, K.; Nakajima, T. Purification and sequencing of mastoparans from the venom of *Apoica pallens* (Hymenoptera:Vespidae).. In: XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular,, 1993, Caxambú, MG. Anais da XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular,. São Paulo : SBBqBM, 1993.

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

Park, H. J. e Moon, D. E. Pharmacologic Management of Chronic Pain. **Korean J Pain.** June; Vol. 23, No. 2: 99-108. 2010.

Pasternak, G. W.; Childers, S. R.; Snyder, S. H. Opiate analgesia: evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptor. **Science**, 208: 504, 1980.

Paul, D.; Yao, D.; Zhu, P.;Minor, L. D.; Garcia, M. M. 5-Hydroxytryptamine3 (5-HT3) Receptors Mediate Spinal 5-HT Antinociception: An Antisense Approach. **JPET.** 298:674–678, 2001.

Pedroso, R. A. e Celich, S. Dor: quinto sinal vital, um desafio para o cuidar em

enfermagem 1. **PAIN**, 15(2), 270-276. 2006.

Pelá, I.R., Rosa, A.L., Silva, C.A.A.; Huidobro-Toro, J.P. Central B2 receptor involvement in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. **Br J Pharmacol**. 118: 1488-1492. 1996.

Pereira, C. F. e Villela, W. V. A acupuntura na rede pública de saúde em Uberlândia-MG. **Rev bras med fam comunidade**. Florianópolis. 7 Supl1: 20. 2012.

Pert, C. B.; Kuhar, M. J.; Snyder, S. H. Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 73 (10): 3729-3733, 1976.

Piccolo, G.; Hisada, M.; Moura, A. B.; Machado, M. F.; Sciani, J. M.; Conceição, I. M.; Melo, R. L.; Oliveira, V.; Lima-Landman, M. T.; Cury, Y.; Konno, K.; Hayashi, M. A. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. **Biochem Pharmacol** 79(3):478-86, 2010.

Piek, T.; Hue, B.; Mantel, P.; Nakajima, T.; Pelhate, M.; Yasuhara, T. Threonine6-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS. **Comp Biochem Physiol**. 96(1):157-62, 1990.

Piek, T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. **Toxicon**. 29(2):139-49, 1991.

Piser, T. M.; Lampe, R. A.; Keith, R. A.; Thayer, S. A. Omegagrammotxin SIA blocks multiple, voltage-gated, Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in cultured rat hippocampal neurons. **Mol. Pharmacol**. v. 48, 131–139, 1995.

Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci**. 25:319 - 325. 2002.

Possani, L. D.; Becerril, B.; Delepierre, M. Tytgat, J. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. **European journal of biochemistry / FEBS**, 264(2), 287-300. 1999.

- Queiroz, M. F.; Barbosa, M. H.; Lemos, R. C. A.; Ribeiro, B. F., Ribeiro, J. B., Andrade, E. V., Silva, Q. C. G., Silva, K. F. N. Qualidade de vida de portadores de dor crônica atendidos em clinica multiprofissional. **Revista de enfermagem e atenção à Saúde**. 2012.
- Rajendra, W.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, 44, 1-17. 2004.
- Ribeiro, S. P.; Mendes, M. A.; Santos, L. D.; Souza, B. M.; Marques, M. R.; Azevedo, J. R.; Palma, M. S. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides** 25(12):2069-2078, 2004.
- Ribeiro Junior, C. Levantamento das espécies de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae) em eucaliptocultura, 2008. 72 p. Dissertação Mestrado em Comportamento Animal Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Rocha e Silva, M, Beraldo, W. T.; Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypson. **Am. J. Physiol.** 156: 261-273, 1949.
- Rocha, A. P. C.; Kraychete, D. C.; Lemonica, L.; Carvalho, L. R.; Barros, G. A. M.; Garcia, J. B. S.; Sakata, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Rev Bras Anesthesiol.** 57: 1: 94-105, 2007.
- Rocha, T.; Soares De Barros, L. L.; Fontana, K.; Souza, B. M.; Palma, M. S.; Cruz-Hofling, A. M. Inflammation and apoptosis induced by mastoparan *Polybia*-MPII on skeletal muscle. **Toxicon**, 2010.
- Saidemberg, D. M.; Silva-Filho, L. C.; Cesar-Tognoli, L. M. M.; Tormenta, C. F.; Palma, M. S. Polybioside: a Neuroactive Compound from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. **Journal of Natural Products**, 2010.
- Sidal, P. J. e Loeser, J. D. Pain following spinal cord injury. **Spinal Cord.** 39, 63 – 73.

2001.

Silva, G. P. Determinação da sequência de cDNA da enzima hialuronidase do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae). 2007. 120f. Tese (doutorado em Biologia celular e Molecular). Rio Claro, SP. 2007.

Silva, M. C. O. S.; Silva, P. A. B.; Silva, L. B.; Soares, S. M. Instrumentos de avaliação da dor crônica em idosos e suas implicações para a enfermagem. **R. Enferm. Cent. O. Min.** 1(4):560-570. 2011.

Silveira, M. M.; Pasqualotti, A.; Colussi, E. L. Prevalência de dor crônica em adultos e idosos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano 10, nº 31, jan/mar 2012.

Smith, E. S. J. e Lewin, G. R. Nociceptors: a phylogenetic view. **J Comp Physiol A**, 195:1089–1106. 2009.

Souza, B. M.; Silva, A. V. R.; Resende, V. M. F.; Arcuri, H. A.; Cabrera, M. P. S.; Neto, J. R.; Palma, M. S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides** v.30 p.1387–1395, 2009.

Souza, B. M.; Mendes, M. A.; Santos, L. D.; Marques, M. R.; Cesar, L. M. M.; Almeida, R. N. A.; Pagnocca, F. C.; Konno, K.; Palma, M. S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v.26 p.2157–2164. 2005.

Souza, J. B. Poderia a Atividade Física Induzir Analgesia em Pacientes com Dor Crônica? **Rev Bras Med Esporte** – Vol. 15, No 2 – Mar/Abr, 2009.

Stucky, C. L.; Gold, M. S.; Zhang, X. Mechanisms of pain. **PNAS**, 98(21), 11845-11846. 2001.

Tan, Z. Y.; Mao, X.; Xiao, H.; Zhao, Z. Q.; Ji, Y. H. *Buthus martensi* Karsch agonist of

skeletal-muscle RyR-1, a scorpion active polypeptide: antinociceptive effect on rat peripheral nervous system and spinal cord, and inhibition of voltage-gated Na(+) currents in dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience letters**, 297(2), 65-8. 2001.

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

Tosteson, M. T.; Holmes, S. J.; Razim, M.; Tosteson, D. C. Melitin lysis of red cells. **J. Membr. Biol.** v. 87 p.35-44. 1985.

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

Turillazzi, S.; Mastrobouni, G.; Dani, F. R.; Moneti, G.; Piereccini, G.; La Marca, G.; Bartolucci, G.; Perito, B.; Lambardi D.; Cavallini, V.; Dapporto, L. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. **J Am Soc Mass Spectrom**. 17:376-83, 2006.

Udenfriend, S.; Nakajima, T.; Pisano, J. J. Structure of the major kinin in wasp (*Polistes*) venom. Proc. 7<sup>th</sup> Int. cong. Biochem. VIII (4) Tokio: 501, 1967.

Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res. Rev.** 46:295 – 309. 2004.

Watanabe, M.; Yasuhara, T.; Nakajima, T. Occurrence of thr6-bradikinin and its analogous peptide in the venom of *Polistes Rothneyi iwatai*. Apud: OHSAKA, A, HAYASHI, K, SAWAI, Y (eds.). *Animal, Plant and Microbial Toxins*, v. II, New York: Plenum, 105-112, 1976.

- Wenzel, J. W. e Carpenter, J. M. Comparing methods: adaptative traits and tests of adaptation. **Phylogenetics and Ecology. Academic Press**, London, pp79-101. 1994.
- Xu, X.; Li, J.; Lu, Q.; Yang, H.; Zhang, Y.; Lai, R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. **Toxicon**, Elmsford, 47:249-253, 2006.
- Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. Chemical investigation of the hornet (*Vespa xanthoptera* Cameron) venom. The structure of a new bradkinin analogu "Vespakinin-X". **Chem Pharm Bull**, 25:935-941, 1977.
- 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** 25(5):527-35, 1987.
- Yoon J.; Jeon, J.; Lee, Y; Cho, C.; Kwon, K.; Shin, J.; Sagar, S.; Wong, R.; Yoo, H. Sweet Bee Venom Pharmacopuncture for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **J Acupunct Meridian Stud**. 5(4):156e165. 2012.
- Yu, H.; Yang, H.; Dongying, M.; Yi, L.; Liu, T.; Zhang, K.; Lai, R.; Liu, J. Vespidae chemotactic peptide precursor from the wasp *Vespa magnifica* (Smith). **Toxicon**, 50 377–382. 2007.



## ANEXO 1



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

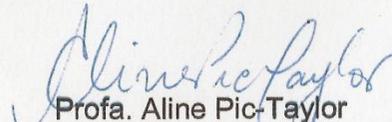
Brasília, 25 de julho de 2011.



**DECLARAÇÃO**

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



  
Prof. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA