

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Decodificando o Papel dos Mastoparanos como
Imunomoduladores da Resposta Imune Humoral Contra
os Imunógenos da Peçonha de Vespas Sociais**

José de Lima Cardozo Filho

Brasília, Distrito Federal

2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

José de Lima Cardozo Filho

**Decodificando o Papel dos Mastoparanos como
Imunomoduladores da Resposta Imune Humoral Contra
os Imunógenos da Peçonha de Vespas Sociais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de doutor em *Biologia Animal*, sob a orientação do Professor Dr. Luciano Paulino da Silva.

Brasília, Distrito Federal

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

DECODIFICANDO O PAPEL DOS MASTOPARANOS COMO IMUNOMODULADORES DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA OS IMUNÓGENOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de doutor em *Biologia Animal*, sob a orientação do Professor Dr. Luciano Paulino da Silva.

Data da aprovação 06/03/2015

Banca Examinadora

Luciano Paulino da Silva (Presidente – Orientador)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Anderson Makoto Kayano (Membro Titular Externo)
Universidade Federal de Rondônia

Eduardo Fernandes Barbosa (Membro Titular Externo)
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Maura Vianna Prates (Membro Titular Externo)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Márcia Renata Mortari (Membro Titular Interno)
Universidade de Brasília

Thales Lima Rocha (Membro Suplente Externo)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL

2015

DEDICATÓRIAS & AGRADECIMENTOS

A vós, caríssimos, reduzida a termo no infindável ambicioso dos vazios, a importância daquilo que representais, que aqui ou n'outro lugar, hercúleo adjetivar seria – e eu nem ousaria...



“ Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, que eu doe aos pobres, que detenha todo o conhecimento e uma fé capaz de mover montanhas, se não tiver amor, nada serei. ”

Adaptado de: *Coríntios I, 13, 1-8.*



Alta Floresta D'Oeste, Rondônia.

** Fa-Mi'a, patra véa **

Aos meus pais, Lusía e José, pajens laís da vida que se dana exuberante no largo dos campos da existência vaporosa, a grata e incontida alegria por terem me concebido, parido e criado tal como o fizeram. *In other words, thanks for all.*

Às minhas irmãs, Matilde e Rafaely, irrefutáveis manifestações da "buniteza" desemparelhada das "fulôzinhas" selvagens dos vãos caatingueiros que rege a limine o élan vital d'alguma "ixistença", a satisfação plena de podê-las contemplar.

Brasília, Distrito Federal.

“Meu Deus! Mas que cidade linda!” **(Renato Russo)**

(**Luciano Paulino**) grato pelo respeito aos despropósitos! (**Bloch**) da verdade o valor, não salva sem amor. (**Duardo**, vulgo **Eduardo Fernandes**) afinal, importam mesmo as hamletianas arguições? (**Tio Piludo**, vulgo **Eder Barbosa**) desde Tirso de Molina, a mais emblemática e bolañesca das versões da famosa personagem. (**Lipe**, vulgo **Felipe Vinecky**) levarei sempre as despreziosas lições sobre a postura do coração na manufatura de todas as coisas pequenas para os que amamos. (**Marília**) pois depois de reconhecido, não dói mais tanto saber que, aqui ou nas faldas do Himalaia, sou o que não preciso e não posso saber. (**Aryana**) sete vidas inteiras eu viveria e ainda me encantariam as vínicas cores do momento. (**D.^a Antônia**) a natureza é talvez que não tenha mesmo juízos. (**Clara**) aquela rubra flor sonha repousar na beleza hispânica das tuas ondas. (**Darli**) d’onde vêm as matizes da tua’lma? (**Jose Gonzalez**) o amor precisa da sorte, e não que se trate de uma mera questão casuística, mas talvez que mais que um sincronismo Junguiano isso seja. (**Nelson Hernandez**) eu sonhei teu sonho e carregava meu filho nas costas, indo embora pra um lugar qualquer. Afinal, não importa chegar. O sublime está nas trilhas e veredas, e eis a boniteza da utopia; “el camiñar”. (**Genilda**) malunga alegre lá do sertão, esparramando seus formosos tentáculos às suas maneiras e trejeitos genuínos d’um torrão castigado e bravio (**Giselle**) eu já vi nas fotos os fatos travestidos e não vi mal nenhum; nunca fui um homem de visão. (**Najarinha**) é inconcebível à compreensão, no imaginativo de mim, que doses próprias d’alguma loucura não possa curar da loucura da solidão. (**Maura Vianna**) o que é que salva nesta selva? (**Mariana Nóbrega**) o fato maior é o fato reconhecido, a despeito de tanto esquecido, de que não escapamos incólumes ao destino termodinâmico das coisas. Então, quem está mesmo no controle? (**Dona Terezinha**) o preto velho perguntou: qual é o teu saber, qual é o teu saber, ô sinhã? Óia o boi na roda a girar. (**Tia Nanã**) O vapor apitou! Óia o samba na chaleira, óia o samba na chaleira, sinhã. É o rito pra vida passar. (**Bia**, vulgo **Beatriz Pinheiro**) quem conta um conto aumenta um ponto: a Bia ganha o jogo. (**Rich**, vulgo **Richardson**) ouço falar das coisas de nós humanos de você e

percebo um Adão canutamense posto aberto, de vísceras francamente expostas, cujas humanidades se flagram nos ranços atávicos dos confins do eu alheio mais cativo. (**Mr. Catra do Cenargen**, vulgo **Marcelo Ramada**) quando rio, acho graça desaguar. (**Natacha Silva**) canta; rio é quando conta das coisas do chão. Anda, continua baixinho tua cantiga sem razão. (**Edriana**) sabes, já não me aflige imaginar que pode não te importar. Sei só, Quixote, que muitos moinhos há. (**Filhote de Wolverine**, vulgo **Thiago**) tem uma composição belíssima do Almir (o Sater) e do Renato (o Teixeira), chama “peão”; (in)felizmente eles desenharam antes que eu o fizesse aqui sobre você. (**Stéphanie Coomans**) e quando eu vejo o céu daqui, eu fico sempre a imaginar se é o mesmo como lá. E nunca isso tinha importado tanto, até que fez sentido. (**Alyne Rodrigues**) e essa estranheza da gente?! E são tantas mágicas... (**Márcia**) sem desenhos de verbo necessariamente, já nem temos mais tanto medo de apalpar a vida. (**Paulinha**) por conta da incontinência literária de que padeço, tomei entre os dedos levemente trêmulos um lenho roliço recheado d’um carvãozinho de roto apontamento e, como que por branda magia, foram-se deitando letras no aconchego d’um papelzinho amarrotado. Não fez falta linha! [...] A carta que escrevinhei a você não pude enviar e o criado mudo agora está cheio segredos e saudades.

Florianópolis, Santa Catarina.

“Num pedacinho de terra [perdido no mar], a beleza sem par [...]” (**Cláudio Alvim Barbosa**)

(**André Báfica**) e (**Fernando Neves**) eu vi a rainha se mover. Nem fez questão e foi naquela direção; indo embora, indo embora.

Cacoal, Rondônia.

(Dimitria) *I have no words for you. I have just feelings. Feel them:*

10

16

22

28

32

38

42

47

52

58

rester sous le milieu

accord facultatif !

(Seu João) e (Dona Derli) diz n'algum lugar dos provérbios que é "como [...] ouro [...] a palavra dita a seu tempo". Grato à riqueza com que têm me presenteado.

Porto Velho, Rondônia.

"As barrancas do Rio Madeira no velho porto escutaram/ O teu choro na cachoeira e o pranto dos Caripunas [...]." (José Pedro Frazão)

(Sr. Myiagi, vulgo Anderson Kayano) da pororoca à perereca, encontrei mais que um batrâquio – amigo, irmão, mestre... (Man, vulgo Rafael de Holanda) "hei, man! Ô! Ô!" (Julie Stephany) que saiu pela tangente foi o amor; rio Madeira que levou... pra o mar, pra o mar.

Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

“O Rio de Janeiro continua lindo/ O Rio de Janeiro, Fevereiro e Março [...]” (Tim Maia)

(Seu Alfredo) “mil e uma” histórias, principalmente aquelas da Lapa de outrora, aquela contada num dístico por Manoel Bandeira na “última canção do beco”. (A venezuelana sessentona que me levou à praia do flamengo numa noite de lua) ao anoitecer ela entrou no quarto do *hostel*/e disse: “voy a la playa”. Fui junto e nunca mais voltei.

Ribeirão Preto, São Paulo.

“[...] Se eu fosse verdadeiramente dessa terra/ E se essa terra fosse minha/ E se eu lhe elegesse minha mãe, haveríamos de dar-nos as mãos e sairíamos pelo mundo, espalhando que um poeta e uma cidade se estimam como a um só se estima [...]” (Cecília Figueiredo)

(Lucas) um acaso termos sido paridos de outros ventres. O encanto é o encontro por força de outros ventos (Ariane) piquinininha, ainda não sei falar de você. (Irmã Marina) eu queria de você um abraço profundo, um silêncio, um abraço sem fim... gosto de você/ perdoa se não saem mais palavras/ é que tem algo em mim que as anda roubando. (Virgínia) “é melhor ser alegre que ser triste” (Vinícius de Moraes). (Tatiane) teus causos contados reviram as emoções nas prateleiras de mim. (Cris) já me perdi com ela. (Maria Célia & Constance Oliver) por permitir a comunhão.

Aos Demais...

(Aos que não foram mencionados – não por *desimportância*) aos que me mostraram a beleza; aos que me levaram à loucura; aos que me deixaram em paz; aos de silêncio e aos de palavra... minha reverência. E em gratidão profunda, rendo-me aos que a mim proporcionaram o infortúnio inevitável da minha condição, que por fortuna da memória já nem recordo mais. Tudo não foi em vão. Em afetiva antítese às inglorias todas, sinto-me hoje "mais forte, mais feliz, quem sabe?!".

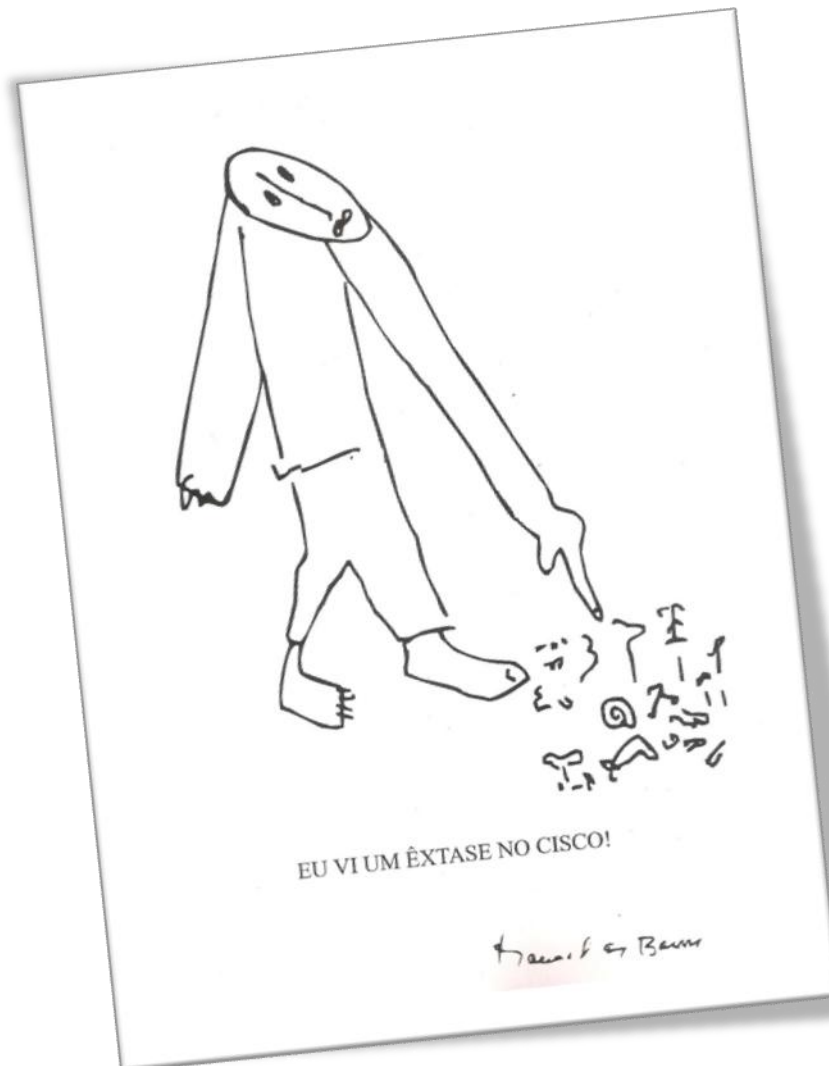
À Brava Gente Brasileira...

"Salve lindo pendão da esperança [...]" (Olavo Bilac)

Os estudos aos quais me dediquei no lastro dos últimos quatro anos (entenda-se bem que com estudos não faço menção única ao cotidiano às vezes fastidioso da academia) não seriam viabilizados sem o patrocínio [na forma de bolsa de estudos concedida pelos órgãos de fomento [CAPES/CNPq] e auxílio moradia] dos dignos e dignas trabalhadores, e aos malandros também, que servem a esta nação até sem a intenção estreita de fazê-lo.

*"Meu fado é o de não saber quase tudo.
Sobre o nada eu tenho profundidades."*

Manoel de Barros



SUMÁRIO

SUMÁRIO	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
APRESENTAÇÃO	15
INTRODUÇÃO	18
2.1 A história natural dos himenópteros resumida	18
2.2 As bases farmacológicas da peçonha de himenópteros sociais	20
2.2.1 Compostos orgânicos não proteicos	21
2.2.2 Proteínas	22
2.2.3 Peptídeos	23
2.3 Manifestações clínicas do envenenamento por himenópteros sociais	27
2.3.1 Reações alérgicas aos venenos animais e o choque anafilático	28
OBJETIVOS	35
MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Reagentes	36
4.2 Captura de animais e extração da peçonha	36
4.3 Isolamento dos mastoparanos da peçonha de <i>Synoeca surinama</i>	37
4.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF e o sequenciamento de peptídeos	37
4.5 Síntese e purificação dos peptídeos	38
4.6 Ensaio de viabilidade celular	39
4.7 Ensaio de liberação de β -hexosaminidase	40
4.8 Análise da degradação diferencial dos mastoparanos	41
4.9 Avaliação da ativação de fatores de transcrição	42
4.11 Análises estatísticas	42
RESULTADOS	43
5.1 Caracterização dos mastoparanos de <i>Synoeca surinama</i>	43
5.2 Síntese e purificação dos peptídeos	45
5.3 Viabilidade celular e liberação de β -hexosaminidase	45
5.4 Ativação de NF κ B e NFAT	46
5.6 Análise da degradação diferencial dos mastoparanos	48
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	66
ANEXOS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** *Venus, Eros e as abelhas*. Ilustração de Alfred Dürer (1514).27
- Figura 2** - Cromatograma referente à separação dos componentes da peçonha de *Synoeca surinama* em coluna de fase reversa mediante aplicação de gradiente linear de solvente B, variando de 5% a 95% em 40 minutos, sob fluxo de 1 mL/min e monitoramento em 216 (linha sólida) e 280 nm (linha pontilhada). **a** Mastoparanos SynS MP I e SynS II, co-eluídos em 31 minutos (63,66%). **a*** SynS MP I glicado, eluído em 30 minutos (62,27%).43
- Figura 3** - Espectros MS (A) e MS/MS (B e C) dos tetradecapeptídeos da fração cromatográfica **a** da peçonha de *S. surinama* obtidos no modo refletido e LIFT, respectivamente. Sequenciamento *De novo* por interpretação manual dos espectros MS/MS dos peptídeos (B) SynS MP I, massa experimental 1595,1 Da e (C) SynS MP II, massa experimental 1629,5 Da.....44
- Figura 4** - (A) Viabilidade das células RBL-2H3 após incubação por 30 minutos com peptídeos em diferentes concentrações. Os valores da viabilidade celular representam a média de dois e três experimentos independentes quando as concentrações dos peptídeos foram 1µM e 7,5 µM, respectivamente. (B) Degranulação relativa dos mastócitos expostos aos mastoparanos SynS MP I e SynS MP II. Os valores apresentados correspondem à média aritmética de três experimentos independentes ± DPM. O teste de Tukey foi usado para a verificação de diferenças estatisticamente significantes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$46
- Figura 5** - Expressão relativa de proteína verde fluorescente em mastócitos (RBL-2H3 NFκB2) como resultado da ativação de (A) NFκB e (B) NFAT induzida pelos mastoparanos SynS MP I e SynS MP II. Os valores apresentados correspondem à média aritmética de três experimentos independentes ± DPM. ** $p < 0,01$ (Teste de Tukey).47

RESUMO

Cardozo Fh, J. L. **Decodificando o Papel dos Mastoparanos como Imunomoduladores da Resposta Imune Humoral Contra os Imunógenos da Peçonha de Vespas Sociais**. 2015. 70 folhas. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2015.

As espécies de vespas pertencentes ao *táxon* Aculeata (Hymenoptera) são caracterizadas pela presença de acúleo (do latim, *aculeus*) inoculador de peçonha. A severidade das manifestações clínicas deflagradas pelos eventos injuriosos infligidos por esses animais às suas vítimas depende tanto dos fatores associados à natureza da peçonha quanto às características idiossincráticas dos organismos infligidos. Os mastoparanos são tetradecapeptídeos polibásicos isolados da peçonha de algumas espécies de vespas capazes de elicitar respostas secretórias dos mastócitos que podem afetar o caráter das respostas imunes. O presente estudo culminou na caracterização estrutural de dois mastoparanos isolados da peçonha de *Synoeca surinama*, SynS MP I e SynS MP II, cujas estruturas primárias são INWLKLGQKIISAL-NH₂ e INWFKLGQKIISAL-NH₂, respectivamente. A liberação de componentes pré-formados e a ativação de fatores de transcrição associados à produção de mediadores em mastócitos quando da incubação dos peptídeos com linhagens de mastócitos mantidas em cultura foi investigada. SynS MP I e SynS MP II a 7,5 µM promoveram a liberação de β-hexosaminidase de mastócitos (10,8% e 7,4%, respectivamente). Ao reduzir a concentração dos peptídeos de 7,5 µM para 1 µM, não houve liberação detectável de β-hexosaminidase. A ativação de NFκB por SynS MP I e SynS MP II quando ensaiados a 7,5 µM (11,87% e 9,12%, respectivamente) não foi significativamente afetada face à redução da concentração dos peptídeos para 1 µM. Não foram observadas também diferenças de ativação de NFκB induzidas por SynS MP I e SynS MP II, assim como não foi constatada a indução da ativação de NFAT por nenhum dos peptídeos. O perfil de resposta exibido pelos mastócitos em razão da incubação com os mastoparanos SynS MP I e SynS MP II nas condições testadas não sugere a participação desses peptídeos como elementos precípuos à configuração de resposta imune tipo II, bem como à produção de IgE contra os imunógenos da peçonha de vespas.

Palavras-chave: *Synoeca surinama*; Alergia; Mastócitos; Mastoparanos.

ABSTRACT

Cardozo Fh, J. L. **Decoding the role of mastoparans as immunomodulators of humoral responses against immunogens from social wasp venom.** 2015. 70 folhas. PhD Thesis – Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2015.

Wasp species belonging to *Aculeata taxon* (Hymenoptera) are characterized by aculeus, classical feature for venom inoculation. The severity of responses depends on both factors associated to the nature of venoms and idiosyncratic characteristics of the organisms inflicted. Mastoparans are polibasic tetradecapeptides isolated from wasp venoms. These peptides are capable of to elicit mast cells responses that may be affect the global immune responses. The present study resulted in the structural characterization of two mastoparans isolated from *S. surinama*, SynS MP I (INWLKLGQKIISAL-NH₂) and SynS MP II (INWFKLGQKIISAL-NH₂). The preformed mediators release and the activation of transcription factors associated to the mediators production in mast cells was investigated by using of mast cell lineages kept in culture. SynS MP I and SynS MP II at 7.5 µM induced the release of β-hexosaminidase activity in mast cells (10.8% and 7.4%, respectively). No detectable release of β-hexosaminidase activity was observed when the peptides concentrations were reduced from 7.5 µM to 1 µM. The NFκB activation in mast cells stimulated with SynS MP I and SynS MP II (11.87% and 9.12%, respectively) was not significantly affected when the test concentration was reduced to 1 µM. Differences were not observed between NFκB activation induced by SynS MP I and SynS MP II. In addition, both of them were not capable of activating NFAT in mast cells. The profile of mast cells degranulation induced during incubation with mastoparans SynS MP I and MP II in the conditions tested did not suggest the participation of these peptides as determinant elements of type II responses, as well as to the IgE production against immunogens from wasp venoms.

Keywords: *Synoecca surinama*; Allergy; Mast cells; Mastoparans.



APRESENTAÇÃO

Remonta aos tempos imemoriais a estreita interação entre homens e uma pequena parcela dos himenópteros – vespas, abelhas e formigas. As fêmeas das espécies do *taxon* Aculeata (Hymenoptera), caracterizadas principalmente pela presença do acúleo (do latim *aculeus* – ferrão, ponta, espinho) inoculador de peçonha, são notáveis pelos eventos mnemônicos desagradáveis proporcionados às vítimas em decorrência da injúria peçonhenta infligida e do quadro clínico que delas se configura. As manifestações clínicas elicitadas pelos himenópteros variam tipicamente de respostas inflamatórias locais a respostas sistêmicas severas, a depender tanto de fatores associados à natureza da peçonha quanto às características idiossincráticas das vítimas (ex: raça, gênero, idade *et coetera*) (Habermann, 1972).

Os venenos de animais – a peçonha de himenópteros em particular – constituem-se de misturas químicas com alto potencial alergênico. As reações alérgicas generalizadas de tipo imediato (urticária, angioedema, asma e choque anafilático) registradas nos envenenamentos de indivíduos previamente sensibilizados são as de maior gravidade clínica, podendo fatalmente resultar em óbito. A sensibilização das vítimas à peçonha dos himenópteros, embora possa ocorrer após um único contato com a peçonha, acontece depois de seguidos envenenamentos mediante a produção de anticorpos (IgE) por linfócitos B contra os alérgenos da peçonha (Ewan, 1998; Ghosh *et al.*, 2009). As imunoglobulinas reativas resultantes da resposta imune humoral aos componentes da peçonha se acumulam nos sítios

periféricos, ancorados à superfície dos mastócitos e de outras células, onde funcionam como receptores prontamente responsivos aos envenenamentos posteriores.

O papel dos mastócitos no âmbito das respostas imunes aos componentes da peçonha de himenópteros, para além da vilania, tem sido enxergado à luz de achados relativamente recentes. A pronta resposta secretória dessas células após o reconhecimento de agentes exógenos é precípua à proteção contra os efeitos deletérios da peçonha de serpentes e abelhas. As enzimas proteolíticas dos grânulos liberados atuam na degradação dos ativos das peçonhas, reduzindo a gravidade das lesões locais e sistêmicas e, conseqüentemente, a morbidade e a mortalidade provocadas pelo envenenamento (Metz *et al.*, 2006). A participação dos mastócitos na resposta imune de memória mediada por anticorpos produzidos contra os imunógenos está associada à neutralização dos antígenos da peçonha e à proteção dos indivíduos sensibilizados (observações realizadas em camundongos), a despeito de ser negativamente relacionada aos efeitos nocivos registrados durante as reações anafiláticas observadas em humanos (Marichal *et al.*, 2013; Palm *et al.*, 2013). A estratégica localização tecidual dos mastócitos enseja ainda o “protagonismo” dessas células na modulação das respostas imunes humorais contra os imunógenos das peçonhas após os primeiros contatos com os ativos presentes nos venenos.

A peçonha dos himenópteros sociais é constituída por uma miríade de ativos farmacológicos capazes de modificar o estado funcional basal dos mastócitos localizados no tecido cutâneo circunvizinho ao local da ferroadada. A fosfolipase A₂ (PLA₂), um dos principais alérgenos isolados da peçonha da maioria dos himenópteros sociais induz respostas imunes tipicamente caracterizadas pela polarização Th2 (linfócitos T auxiliares do tipo 2), assim como outros alérgenos cujos desdobramentos resultam na produção de anticorpos (Marichal *et al.*, 2013). Os mecanismos pelos quais esse tipo particular de resposta aos alérgenos se estabelece são ainda pouco compreendidos, em que pese o montante de estudos acerca da

temática. Neste contexto, chamo a atenção a dois aspectos importantes: *i*| em humanos¹, as respostas Th2 resultam na produção de IgE e não raramente levam a ocorrências graves (anafilaxia); *ii*| em camundongos, a produção de IgE resultante da resposta Th2 confere proteção aos organismos contra a ação direta dos alérgenos sobre os tecidos. Ora, quais mecanismos determinam a dicotomia das respostas imunes às toxinas que resultam em efeitos distintos conforme o organismo (mamíferos)?

Os mastoparanos, tetradecapeptídeos polibásicos isolados da peçonha de algumas espécies de vespídeos, induzem em mastócitos respostas secretórias, culminando reconhecidamente na liberação de componentes pré-formados e armazenados nos grânulos exocíticos dessas células. A indução da síntese *de novo* de mediadores em células do lavado peritoneal de camundongos (Wu *et al.*, 1999) sugere inclusive que o perfil de produção de mediadores neo-sintetizados em mastócitos pode ser afetado pela ação farmacológica dos mastoparanos, de tal modo que se justifique atividade adjuvante, ainda que fraca, exibida pelos mastoparanos na produção de IgE e IgG (King *et al.*, 2003). O estudo que ora se vos apresenta presta contribuição no âmbito da investigação dos mecanismos que direcionam a resposta imune adquirida aos imunógenos da peçonha de vespas ao estabelecer, *in vitro*, como os mastoparanos podem interferir na modulação da resposta imune mediante a indução da produção e a liberação de mediadores pró-inflamatórios e imunomoduladores de mastócitos.

¹ A ocorrência de respostas alérgicas exacerbadas não é restrita a humanos.

II INTRODUÇÃO

2.1 A história natural dos himenópteros resumida

A ordem Hymenoptera – grupo holometábolo que apresenta complexidade mista de traços primitivos e autapomorfismos, cujo surgimento é estimado para o final do período Jurássico – constitui-se atualmente como a terceira maior ordem por número de espécies de insetos já descritas – cerca de 130.000 espécies distribuídas ubiquamente pelo planeta (exceto na Antártica) –, embora esse número possa ser tanto maior quanto as estimativas de Stork o fazem se aproximar a 2,5 milhões de espécies (Stork, 1996). Os himenópteros são morfológicamente caracterizados pela ligação das asas posteriores e as asas anteriores por meio de uma série de ganchos (*hamuli*), sendo que os ramos anais da asa anterior não alcançam a margem da asa posterior. Uma das mais notáveis características da ordem é a fisiologia reprodutiva dos himenópteros. As fêmeas himenópteras ovipositoras intervêm de forma ativa no controle da fertilização dos ovos e, por consequência, na determinação sexual da prole, fenômeno conhecido como haplodiploidia. As fêmeas himenópteras são indivíduos diploides que se desenvolvem a partir da fertilização dos ovos. Caso a fertilização não ocorra, o desenvolvimento dos ovos segue seu curso natural, resultando na formação de indivíduos haploides (os machos) (Grimaldi, 2005).

A grande diversidade averiguada entre os himenópteros decorre das lentas e graduais transformações que, cumulativamente, configuram a progressiva modificação das espécies ancestrais. Os membros da ordem Hymenoptera estão atualmente distribuídos em dois grandes *taxa*, a saber, a superfamília Symphyta (grupo parafilético) e a subordem Apocrita. Symphyta não é considerado um grupo natural, mas sim um grupo basal da ordem Hymenoptera caracterizado principalmente pela conservação da maioria dos atributos

primitivos da Ordem – especialmente a região abdominal sem modificação. Cerca do sétimo percentil das espécies dos himenópteros conhecidos estão agrupados entre os sínfitas, somando aproximadamente dez mil espécies distribuídas em catorze famílias. A subordem Apocrita é adjetivada por traços denotativos de seu maior grau de derivação, sobre os quais aqui se salienta as modificações do aparelho ovipositor, o aperfeiçoamento do sistema parasítico e a marcante constrição abdominal entre os segmentos 1 e 2. A maioria das espécies himenópteras se encontra listada entre os apócritas e, naturalmente, uma impressionante diversidade morfológica e comportamental, associada à sua história natural, emerge da análise desse grupo numericamente tão vasto (Gaston, 1991; Manson & Huber, 1993; Fernandez & Charkey, 2006; Grissell, 1999; Austin & Dowton, 2000; Guillot, 2005; Vilhelmsen, 2001; Foottit, 2009).

A sociabilidade é um atributo evolutivo de grande significância, notável em diversos grupos de insetos por conferir aos indivíduos maior capacidade defensiva e de provimento, resultando, conseqüentemente, no aumento da competitividade das espécies sociais. Especula-se que a sociabilidade tenha surgido entre os himenópteros com o aparecimento do hábito de esconder a presa após a captura como garantia de provisão futura para o desenvolvimento das larvas. A complexa organização social observada entre alguns himenópteros, mais especificamente entre os apócritas, é um traço comportamental adquirido no lastro de um extenso período, a despeito de o hábito social ter uma história evolucionária independente de sua ocorrência na ordem Hymenoptera. As estruturas sociais mais complexas se estabeleceram com sucesso entre espécies que assimilaram o hábito de formar ninhos como padrão comportamental, comumente verificado em espécies das famílias Sphecidae e Apidae, da superfamília Apoidea, e Formicidae e Vespidae, da superfamília Vespoidea. A família Vespidae é um grupo monofilético (Andena, 2007) constituído por espécies entre as quais se verifica desde grupos de hábitos totalmente solitários a grupos em que se registra complexa

organização e hierarquização social. Estes últimos são comumente encontrados nas subfamílias Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae. As demais subfamílias, Eumeninae e Masarinae, são constituídas por espécies solitárias. O desenvolvimento das estruturas sociais entre os himenópteros ocorreu a altas taxas, envolvendo um grande número de espécies se comparado ao verificado em insetos de outras ordens, devendo-se esse fenômeno principalmente às características da fisiologia reprodutiva da ordem Hymenoptera (Hunt, 2007; Schmitz e Moritz, 1998). Além disso, as importantes transformações morfofuncionais ocorridas no aparelho ovipositor das espécies foram providenciais para o sucesso do comportamento social, uma vez que convergiram na formação do aparato peçonhento, artifício utilizado tanto em atividades relacionadas à caça e provimento de alimentos como meio de defesa das colônias contra predadores (Grimaldi e Engel, 2005).

2.2 As bases farmacológicas da peçonha de himenópteros sociais

As fêmeas aculeatas dispõem de um arsenal químico do qual fazem uso para combate a ameaças à prole ou para a imobilização de uma presa em potencial. As primeiras investigações acerca das características bioquímicas e farmacológicas da peçonha de himenópteros de que se tem notícia foram conduzidas em *Apis mellifera*² por dois químicos alemães, Brandt e Ratzeburg, por volta de 1837. Posteriormente, em 1897, Langer obteve um extrato alcoólico dos componentes da peçonha de *A. mellifera*, entre os quais Flury detectou aquilo que ele atribuiu serem ácidos graxos insaturados, ácido fosfórico, acetilcolina e outros compostos nitrogenados (Cavagnol, 1977). Contudo, o avanço das tecnologias agregadas ao arcabouço metodológico aplicado à caracterização dos compostos químicos fomentou a elucidação estrutural de uma quantidade vertiginosa de moléculas da peçonha de

² *A. mellifera* é uma abelha social de origem asiática e europeia cuja importância econômica direta se reconhece pela produção do maior montante do mel e própolis comercializados mundialmente (Wiese, 1984).

himenópteros em geral. Na década de 1950, detalhes bioquímicos da composição da peçonha dos himenópteros foram sinalizados por estudos pioneiros realizados com a peçonha da própria abelha melífera, revelando uma mistura de elevado grau de complexidade molecular, cuja constituição varia desde micromoléculas a moléculas estruturalmente mais complexas (Cavagnol, 1977; Leluk, 1989; Hoffman, 2006; Palma, 2006).

2.2.1 Compostos orgânicos não proteicos

A despeito da predominância de proteínas e peptídeos, a peçonha de himenópteros é marcada pela presença de alcaloides, terpenos, polissacarídeos, aminas biogênicas, ácidos orgânicos e aminoácidos (Bhoola *et al.*, 1961; Blum, 1981; Schmidt, 1986). A peçonha de espécimes do gênero *Solenopsis* é marcada pela abundância de alcaloides, embora alcanos de cadeia longa também tenham sido identificados. Compostos como as catecolaminas, a acetilcolina e alguns aminoácidos neuroativos, estão especialmente associados aos mecanismos de comunicação entre os indivíduos de espécies himenópteras, seja para fins reprodutivos, nutritivos ou defensivos. A histamina é um dos mais representativos componentes de baixa massa molecular isolados da peçonha de himenópteros sociais, promovendo significantes alterações sobre a homeostase – induzindo contração da musculatura lisa, alterando a permeabilidade vascular, modulando a respostas imunes etc. –, que resultam em diversos processos fisiopatológicos decorrentes dos envenenamentos (Zampeli e Tiligada, 2009). A serotonina também é recorrentemente isolada da peçonha de vespas sociais, sendo-lhe atribuída parte das propriedades irritantes do veneno face à dor e à sensação de formigamento por ela causada quando inoculada (Laddha *et al.*, 2012).

2.2.2 Proteínas

A fosfolipase A₂ (PLA₂) isolada de *Apis mellifera* em 1954 por Neumam & Haberman é a proteína de maior expressão na peçonha deste animal, somando cerca de 15% da massa seca da peçonha coletada. Trata-se de uma enzima glicoproteica de ampla ocorrência entre os himenópteros sociais – as glicosilações somam cerca de 22% da massa da molécula – dotada de atividade lipolítica dependente de cálcio (Hoffman, 2006). As PLA₂ isoladas de espécies himenópteras distintas apresentam diferenças significativas nas regiões da superfície estrutural das moléculas, enquanto as regiões determinantes para a atividade enzimática são altamente conservadas. A PLA₂ é reconhecidamente um dos mais importantes alérgenos isolados em peçonhas, induzindo respostas imunes em diversos níveis. A ação biológica dessas enzimas é mediada pela ação dos produtos da hidrólise de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, isto é, lisofosfatídeos e ácidos graxos livres. O reconhecimento da PLA₂ pelo sistema imune inato é mediado pelos produtos da atividade enzimática desta molécula sobre os fosfolipídios de membrana. A ação direta e/ou indireta da PLA₂ exerce papel determinante na produção de mediadores pró-inflamatórios e imunomoduladores, que tem consequências expressivas nas alterações fisiopatológicas induzidas pela peçonha (Hoffman, 2006).

As fosfolipases expressas na peçonha de vespas sociais exibem características estruturais e funcionais bastante distintas das fosfolipases de abelhas. Os tipos mais comuns observados em vespídeos são fosfolipases com especificidade do tipo A₁B. Ao contrário do observado nas abelhas, as fosfolipases isoladas da peçonha de vespas não costumam exibir glicosilação. A esse respeito, é conveniente salientar que a imunorreatividade cruzada exibida entre fosfolipases estruturalmente distintas depende da proximidade filogenética das espécies de que são isoladas, i.e., quanto maior a proximidade filogenética entre as espécies, maior a reatividade cruzada apresentada entre suas respectivas enzimas (Dongol *et al.*, 2014).

As hialuronidases são também isoladas tanto em abelhas quanto em vespas. A hialuronidase, proteína composta por cerca de 7% de glicosilação, corresponde cerca de 2% a 3% do total da massa seca da peçonha de abelha. Essas enzimas pertencem à família das glicosil hidrolases, que degradam ligações glicosídicas do tipo $\beta 1 \rightarrow 4$ entre N-acetil-glicosamina e ácido D-glicurônico do ácido hialurônico. A ação desta enzima é fundamental para a difusão dos ativos da peçonha, potencializando-lhes os efeitos (Haberman, 1972; Scott, 1990; Hoffman, 2006; Costa & Palma, 1999; Ho & Ko, 1988, Yang *et al.*, 2008).

As moléculas relacionadas ao antígeno 5 isoladas da peçonha de vespas sociais são consideradas os alérgenos mais potentes isolados dos venenos de vespídeos. No entanto, não se verifica na literatura consultada quaisquer atividades biológicas já caracterizadas. Outro aspecto intrigante acerca desse grupo de moléculas é o elevado grau de identidade com um grande número de proteínas de origens muito diversas, inclusive na secreção de helmintos durante a fase de maturação sexual, venenos de répteis e proteínas secretadas por órgãos salivares e reprodutivos (Hoffman, 2006). Entre as moléculas relacionadas ao antígeno 5 isoladas dos seis gêneros de vespídeos, as alterações estruturais observadas se referem às regiões da superfície molecular, que exibem baixos índices de conservação (King, 1978; Dongol *et al.*, 2014).

2.2.3 Peptídeos

A caracterização e a identificação de peptídeos da peçonha de himenópteros experimentaram franca ascensão após o advento da espectrometria de massa, sendo impulsionadas pelos significativos avanços nas plataformas de cromatografia líquida de alta eficiência, de sequenciamento automático por degradação N-terminal de Edman e de sequenciamento de DNA complementar. O clássico trabalho apresentado por Fischer e

Neumann (1961) resultou na caracterização estrutural da melitina, isolada da peçonha de *Apis mellifera*. Os 26 resíduos de aminoácidos da estrutura da melitina estão dispostos ao longo da cadeia polipeptídica de modo a determinar seu comportamento físico-químico. Os resíduos básicos e hidrofóbicos estão localizados entre os 20 primeiros resíduos, enquanto os resíduos básicos e hidrofílicos estão posicionados na região C-terminal, entre as posições 21 e 26. A ação detergente da melitina decorrente de sua interação com membranas biológicas é fundamental para a toxicidade do veneno, uma vez que este peptídeo perfaz aproximadamente a metade da massa seca da peçonha de *Apis mellifera* e atua como o principal agente difusor dos demais componentes da peçonha (Fischer & Neumann *apud* Cavagnol, 1977; Fitzgerald & Flood, 2006).

A apamina é um octadecapeptídeo também isolado de *Apis mellifera* capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica, podendo causar sérias alterações do sistema nervoso central mediante alteração da estabilidade de membranas biológicas. A apamina possui em sua estrutura quatro resíduos de cisteína que formam duas ligações dissulfeto, atribuindo rigidez e elevado grau de estabilidade à estrutura da molécula. A estabilidade da apamina é uma característica que esses peptídeos têm em comum com o peptídeo degranulador de mastócitos (MCD), que possui o mesmo número de resíduos de cisteína em sua estrutura. O MCD é um potente indutor de degranulação de mastócitos, causando liberação de histamina quando inoculado. Outros peptídeos isolados da peçonha de *Apis mellifera* têm menor representatividade quantitativa, somando menos que 0,5% do total da massa seca do veneno. Entre esses peptídeos estão a secapina e tertiapina, que, a exemplo do MCD, promovem a degranulação de mastócitos e outras células (Banks & Shipolini *apud* Palma, 2006).

Os peptídeos quimiotáticos isolados da peçonha de vespídeos estão associados não somente à indução de quimiotaxia celular, exibindo atividade membranolítica pronunciada e potencial antimicrobiano de largo espectro (Hagashijima, 1979). Esses peptídeos exibem alta

similaridade com os mastoparanos (discutidos a seguir), apresentando em suas sequências resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e a ocorrência frequente de resíduos de arginina e lisina (Nakajima, 1986). As cininas isoladas da peçonha de vespas apresentam sequências contendo entre nove e 18 resíduos de aminoácidos, cujas porções C-terminais apresentam alta identidade à estrutura da bradiginina (Dongol *et al.*, 2014). Essas cininas apresentam potente atividade farmacológica semelhante à da bradiginina, causando, a exemplo, constrição ou relaxamento muscular e ativação de leucócitos. A saber, as ações constritiva e relaxante das cininas são mediadas por receptores distintos e a depender do tecido (Marceau *et al.*, 1998)

Os mastoparanos, chamados genericamente na atualidade de peptídeos antimicrobianos, constituem uma classe de tetradecapeptídeos polibásicos ricos em resíduos de lisina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Leu, Phe) isolados da peçonha de vespídeos, cuja funcionalidade mais citada e revisitada pela literatura é a capacidade de induzir a degranulação de mastócitos. O mastoparano isolado da peçonha de *Vespula lewisii* (VesL MP), cujas características estruturais foram elucidadas por Hirai *et al.* (1979), foi o primeiro peptídeo descrito da classe. A descrição estrutural apresentada pelos autores indicava uma amidação na região C-terminal de 14 resíduos de aminoácidos em sequência na qual se destacava a predominância de resíduos de caráter básico e hidrofóbico e a frequente ocorrência de resíduos de lisina, que se provaram essenciais à atividade degranuladora. A disposição dos resíduos ao longo da estrutura dos mastoparanos possibilita a adoção de conformação em α -hélice dotada de caráter anfipático quando em contato com vesículas lipídicas, condição que viabiliza a interação com membranas biológicas e determina as atividades que dela decorrem. O VesL MP truncado, constituído dos últimos sete resíduos de aminoácidos da porção C-terminal, apresentou apenas 1/10 da atividade do peptídeo inteiro, o mesmo não sendo observado para o peptídeo truncado dos primeiros sete resíduos de aminoácidos da porção N-terminal, verificando adicionalmente a inativação da atividade

degranuladora do VesL MP quando desafiado pela atividade enzimática de serinoproteases (Hirai *et al.*, 1979). *A posteriori* outros peptídeos similares foram isolados da peçonha de outras espécies (Hirai *et al.*, 1979; Higashijima *et al.*, 1983; Argiolas & Pisano, 1984; Nakajima, 1985; Nakajima *et al.*, 1986; Mousli *et al.*, 1992; Song *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1994; Konno *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004).

Mastoparanos são considerados secretagogos inespecíficos. Esta é pelo menos a definição trazida por Higashijima (1988) em seu trabalho, no qual mostrou a ação dos mastoparanos diretamente sobre proteínas regulatórias GTP-ligantes (proteínas G), aumentando-lhes a atividade de ATPase e a taxa de ligação a nucleotídeos. Ao ativarem a proteína G_0 , os mastoparanos deflagram uma cascata de eventos que resulta na mobilização de íons Ca^{2+} . Uma vez ativada, a proteína G_0 promove a ativação da fosfolipase C, que catalisa a formação dos mensageiros secundários 1,4,5 trifosfato inositol e diacilglicerol a partir da hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ($PI(4,5)P_2$). O 1,4,5 trifosfato inositol (IP_3) induz a liberação do estoque de Ca^{2+} ao ativar receptores (IP_3Rs) no retículo endoplasmático. O diacilglicerol, por sua vez, ativa uma série de isoformas de proteína quinase C que regulam a transcrição gênica de mediadores glicoproteicos ou polipeptídicos (citocinas), a liberação de metabólitos derivados do ácido araquidônico (eicosanoides) e a mobilização dos grânulos durante a degranulação. Os mastoparanos podem, ainda, promover o influxo de Ca^{2+} extracelular por interagirem e desestabilizarem membranas celulares. Adicionalmente, os mastoparanos podem ativar a PLA_2 , levando à liberação de ácido araquidônico, precursor requerido para a produção de eicosanoides tais como leucotrieno C_4 e prostaglandina D_2 (Tohkin *et al.*, 1991; Okano *et al.*, 1985; Argiolas *et al.*, 1983).

2.3 Manifestações clínicas do envenenamento por himenópteros sociais

Em um fragmento da poesia de Anacreonte (570-485 a.c), encontra-se um trecho narrativo sobre quando Eros foi picado por um himenóptero entre as flores do jardim. Em diálogo com sua mãe, Venus, o menino diz da terrível dor que lhe fora infligida por uma *serpente voadora* a que os lavradores chamavam de abelha, ilustrando sob perspectiva poética um dos sinais clínicos imediatos do envenenamento por himenópteros (Figura 1). As manifestações clínicas decorrentes do envenenamento dependem, em geral, da espécie causadora do envenenamento, da quantidade de peçonha inoculada, do local de injeção e do nível de hipersensibilidade da vítima, entre outras variáveis (Cavagnol, 1977). Os sinais e sintomas clínicos imediatos observados após a injúria (dor, inflamação local, prurido etc.) são resultantes da ação biológica dos compostos de baixa massa molecular, especialmente aminas biogênicas tais como histamina, serotonina e acetilcolina, que promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, respectivamente, na microrregião da picada (dados observados em mamíferos), corroborando ainda para a facilitação do acesso aos sítios de ação e amplificando a capacidade efetiva dos demais componentes da peçonha (Habermann, 1972).



Figura 1 *Venus, Eros e as abelhas*. Ilustração de Alfred Dürer (1514).

A ocorrência de múltiplas ferroadas conduz ao estabelecimento de quadro caracterizado normalmente por inchaço e dores nas articulações, petéquias hemorrágicas, tonturas, fraqueza, náusea, diarreia e convulsões. Se numerosas ferroadas são infligidas em um curto prazo, podem se suceder edema generalizado, hemoglobinúria, hipotensão severa, incontinência e choque, havendo amenização dos sintomas a partir de 72 horas após o envenenamento (Habermann, 1972). Segundo Fitzgerald *et al.* (2006), cerca de quinhentas ferroadas podem levar um humano adulto a óbito, sendo potencialmente fatal para a maioria dos mamíferos uma dose de veneno correspondente a vinte ou mais picadas por quilograma de massa corporal. A maioria das mortes provocadas por envenenamentos é, no entanto, decorrente das reações de hipersensibilidade aos antígenos da peçonha de himenópteros, ocorridas poucos minutos após a picada ter sido infligida (Fitzgerald *et al.*, 2006). A reação anafilática sistêmica é clinicamente caracterizada pela dificuldade de respiração, tosse seca, constrição da garganta, angina, ruborização da pele, edema de glote e hipotensão. Nos casos em que a anafilaxia se estabelece mediante a participação efetiva dos mastócitos, a taquicardia é observada como provável resultado da ação histamínica (Finkelman, 2007).

2.3.1 Reações alérgicas aos venenos animais e o choque anafilático

Os alérgenos da peçonha de himenópteros elicitam respostas de células T CD4⁺ auxiliares do tipo II (Th2), culminando na configuração de resposta imune do tipo II, cujos desmembramentos convergem caracteristicamente na produção de IgE específicos. A produção de anticorpos contra os imunógenos, cujo papel mostrou estar associado à neutralização dos antígenos da peçonha e à restrição dos efeitos deletérios por eles provocados, é também negativamente relacionada aos efeitos nocivos observados em indivíduos sensibilizados durante as reações alérgicas (Marichal *et al.*, 2013). As reações

alérgicas em sua maioria são mediadas por anticorpos IgE ancorados a receptores de alta afinidade (FcεRI) dispostos na superfície de basófilos circulantes e mastócitos teciduais (Marichal *et al.*, 2013). Nessas condições, a associação dos antígenos induz a ativação de mastócitos e basófilos, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios (histamina, principalmente) e enzimas. O choque anafilático, clinicamente caracterizado por edema de glote e hipotermia, é resultado, dentre outros fatores, da ação da histamina liberada na degranulação de mastócitos e basófilos ativados. Quadro clínico semelhante é configurado por uma via alternativa que envolve IgG e a ativação de receptores de baixa afinidade para IgG (FcγRIII) dispostos na superfície de macrófagos. A deflagração da via alternativa não só exige uma carga antigênica maior que aquela necessária para a ativação da via clássica como inibe a ativação da via clássica e, a ocorrência de anafilaxia configurada pela via clássica é mais frequente em humanos, embora haja algumas evidências de quadros anafiláticos determinados pela via alternativa (Strait *et al.*, 2002; Strait *et al.*, 2006; Finkelman, 2007).

2.3.1.1 Biologia dos mastócitos no âmbito das alergias aos venenos animais

As primeiras descrições acerca das características morfológicas dos mastócitos de humanos são encontradas nos registros de Paul Ehrlich datados do final do século XIX. Os mastócitos são derivados de progenitoras hematopoiéticas CD13⁺CD34⁺CD117⁺ da linhagem mieloide que se desenvolvem sob a influência do fator de célula tronco (SCF), interleucina-4 (IL-4) e outras citocinas que regulam o desenvolvimento dos mastócitos (Bischoff, 2007). Os mastócitos imaturos migram para regiões de fronteira – pele e demais barreiras mucosas e tecido vascular –, onde completam o estágio final de diferenciação sob a influência dos microambientes e participam, finalmente, de um elevado número de processos fisiológicos, tais como o controle do fluxo sanguíneo, da coagulação, do peristaltismo, da contração de

musculatura lisa, dos processos de cicatrização e na regulação das respostas imune inata e adaptativa, inclusive dos processos que demandam o reconhecimento de agentes exógenos (Lu, 2006; Gilfillan e Tkaczyk, 2006; Bischoff, 2007; Abraham, 2010). Apesar de apresentarem os característicos grânulos eletrodensos no citoplasma, mastócitos de regiões distintas, ao atingirem a maturidade fenotípica, exibem caracteres fenotípicos diversificados. A distinção das características morfológicas e a plasticidade funcional apresentada pelos mastócitos são regidas pela influência dos fatores de regulação dos microambientes e pelo contato com agentes exógenos. Em roedores, os mastócitos são agrupados em duas categorias gerais: mastócitos da mucosa e do tecido conjuntivo. As distinções entre esses grupos vão desde a composição dos grânulos até o tipo de resposta elaborada contra os desafios parasíticos (Abraham, 2010).

As funções biológicas desempenhadas pelos mastócitos são levadas a termo principalmente por meio da liberação de potentes mediadores inflamatórios e imunomoduladores do amplo repertório químico armazenado nos grânulos intracelulares após um estímulo adequado (Bischoff, 2007; Metz *et al.*, 2007). Os mediadores pré-sintetizados de maior relevância para a patogênese da inflamação alérgica são a histamina e o leucotrieno C₄ (LTC₄) (que induzem produção de muco, formação de eritema, secreção de eletrólitos, constrição de musculatura lisa e ativação de células nervosas), leucotrieno B₄ (que afeta neutrófilos e células progenitoras de mastócitos), prostaglandina D₂ (que funciona como um agente pró-inflamatório e mediador lipídico de células Th2 regulatórias). Algumas citocinas como a IL-3 (recrutamento e ativação de basófilos), IL-5 (recrutamento e ativação de eosinófilos) e IL-13 (indução da síntese de IgE em células B) também participam desses processos inflamatórios. Em murinos, os mastócitos representam uma fonte importante do fator de necrose tumoral (TNF), embora, em humanos, mastócitos oriundos da mucosa

produzam pequenas quantidades de TNF se comparadas às produzidas em murinos ou em monócitos humanos (Bischoff, 2007).

Os mastócitos podem ser ativados por vias dependentes e independentes da formação dos complexos IgE/antígeno – a mais importante via de ativação dos mastócitos. A ancoragem de IgE à superfície celular dos mastócitos se dá por alguns modos, entre os quais se destaca o mecanismo descrito por Cheng *et al.* (2013). Por esse mecanismo os mastócitos da pele de camundongos, localizados nas regiões perivasculares, estendem processos celulares através da parede vascular e realizam a captura seletiva de imunoglobulinas E circulantes. O índice de IgE ancoradas à superfície dos mastócitos está, portanto, relacionado à titulação desses anticorpos na corrente sanguínea, inclusive porque altos títulos de IgE monomérica induzem a elevação da expressão de FcεRI (receptor de alta afinidade para anticorpos de isotipo E). Ancorada a receptores da superfície dos mastócitos, basta que a IgE interaja com antígenos pelos quais há afinidade para que ocorra a pronta deflagração das vias próprias de sinalização que culminam na ativação celular e numa série de respostas ao estímulo (Cheng *et al.*, 2013). A presença de IgE monomérica ancorada à superfície parece ser ainda um importante fator na sobrevivência dos mastócitos, aumentando-lhes a resistência à apoptose (Kawakami e Galli, 2002).

Além dos mecanismos dependentes de componentes humorais, os mastócitos podem ser ativados por citocinas, fatores de crescimentos e outros estímulos. O fator de células tronco (SCF), além de fornecer sinais para o desenvolvimento e sobrevivência dos mastócitos, pode regular a degranulação dependente de ativação via FcεRI ou mesmo induzir a degranulação dos mastócitos (Bischoff e Dahinden, 1992; Undem *et al.*, 1994). A IL-4 atua em mastócitos maduros de humanos em conjunto com o SCF na regulação da sobrevivência, na proliferação e na ativação mediada por FcεRI. A IL-3 apresenta ação semelhante à apresentada por IL-4 sobre os mastócitos, porém, menos intensa. O efeito supressor do

sistema imune mediado por células T regulatórias (T_{Reg}) sob influência dos mastócitos depende da ação de IL-9 sobre esses últimos (Lu *et al.*, 2006). Os mastócitos da pele de humanos, que se assemelha aos mastócitos do peritônio de murinos em alguns aspectos, são responsivos a alguns componentes como anafilatoxinas C3a e C5a do sistema complemento e à substância P. A ativação dos mastócitos pode também ocorrer por intermédio dos receptores de padrões moleculares associados a micro-organismos (MAMPs). Em humanos, os mastócitos podem expressar receptores relacionados a *toll* (TLR) (*TLR1*, *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR7* e *TLR9*), embora esses receptores não sejam necessariamente expressos de modo consistente em todas as células (Bischoff, 2007). A ativação dos mastócitos via TLRs resulta na produção de uma série de citocinas e quimiocinas que determinam a maturação e o comportamento de células, bem como a modulação do comportamento de células T e outras células inflamatórias (von Stebut *et al.*, 2003; Metz *et al.*, 2007). Estudos recentes têm demonstrado mecanismos inibitórios envolvidos na regulação da ativação dos mastócitos. Os principais inibidores são os ligantes de receptores contendo motivos inibitórios dependentes de tirosina de imunoreceptores (ITIM) (por exemplo, *FcγRIIb*), IL-10, *TGFβ*, *CD200* e moléculas de sinalização intracelular entre outros (Bischoff, 2007).

O conteúdo proteico dos grânulos mastocíticos é constituído majoritariamente por proteases associadas às proteoglicanas da matriz granular. A composição das proteases que constituem os grânulos varia conforme o subtipo celular e os estímulos recebidos, havendo fortes indícios de que o perfil das proteases armazenadas nos grânulos secretórios pode sofrer alteração ao longo de um processo infeccioso (Ghildyal *et al.*, 1992; Toru *et al.*, 1998). Mastócitos do tecido conjuntivo de camundongos contêm triptases e quimases associadas à heparina, enquanto as células da mucosa apresentam apenas quimases associadas a sulfato de condroitina (Abraham, 2010). A frequência de RNAs mensageiros (mRNAs) codificadores de algumas enzimas chega a ser mais alta que a de genes expressos constitutivamente

(Lutzelschwab *et al.*, 1997), um endosso quantitativo à importância dessas enzimas no âmbito das funções reconhecidamente assumidas pelos mastócitos em diversos processos fisiopatológicos. Nos envenenamentos provocados por animais peçonhentos, inclusive por abelhas, demonstrou-se que as enzimas liberadas dos mastócitos na degranulação hidrolisam alguns componentes da peçonha, reduzindo a morbidade e a mortalidade dos animais após os envenenamentos (Metz *et al.*, 2006). Há evidências também da participação de muitas dessas enzimas na modulação das respostas adaptativas a imunógenos, a exemplo a atuação da RMCP-I (do inglês, *rat mast cell protease-I*) na indução da produção de anticorpos IgE por linfócitos B na presença de IL-4 demonstrada por Yoshikawa *et al.* (2001).

O papel dos mastócitos nas reações alérgicas e outras respostas imunes associadas à IgE é bem documentado, tal como a capacidade natural de modelarem a imunidade inata tanto na condição de iniciadores como na de efetores (Gali *et al.*, 2005). A pronta resposta ao reconhecimento dos componentes da peçonha de himenópteros determina a participação dos mastócitos na indução da migração, maturação e função das células dendríticas, bem como de linfócitos B e T, e, portanto, na orquestração de processos relacionados a respostas imunes inatas e/ou adaptativas (Metz, 2008). A ação dos mastoparanos sobre mastócitos nas proximidades da ferroada, promovendo a liberação de componentes pré-formados e armazenados nos grânulos exocíticos dessas células, parece ser uma variável importante nos eventos que ditam os rumos das respostas imunes aos alérgenos da peçonha. O mastoparano isolado de *Vespula vulgaris* (VesV MP) exibe baixa atividade como adjuvante na resposta inflamatória mediada pela produção de IgE e IgG1 específicos contra o alérgeno VesV 5 em camundongos BALB/c quando administrado via intraperitoneal e cutânea, sugerindo a configuração de uma resposta imune do tipo Th2. embora não se tenha observado indícios da secreção de TNF- α em células peritoneais (King *et al.*, 2003), VesV MP induz a liberação de prostaglandina E₂ e TNF- α em linhagem J744 de macrófagos de camundongos mantidos em

cultura. Esses indícios levaram à proposição da hipótese de que os mastoparanos são determinantes no estabelecimento das respostas humorais aos imunógenos da peçonha de vespas sociais em virtude de sua ação sobre mastócitos. Visando à investigação do papel dos mastócitos, por meio das respostas iniciadas por mastoparanos, na modulação da resposta humoral aos imunógenos da peçonha de vespas sociais, a degranulação e a ativação de fatores de transcrição NFκB e NFAT em mastócitos após a incubação com mastoparanos isolados da peçonha da vespa social *Synoeca surinama* a concentrações micromolares foram avaliadas.

Synoeca surinama constitui o gênero *Synoeca* junto a outras quatro espécies, a saber: *S. chalibea*, *S. virgínea*, *S. septentrionalis* e *S. cyanea*. Trata-se de uma espécie social que exhibe comportamento de enxame em ocasiões de algum estresse, caracterizada pelo aspecto azul-metálico do corpo e pelas asas escuras. As principais características morfológicas utilizadas na distinção desta espécie são a projeção do vertex e a esparsa distribuição de pontilhados no primeiro segmento da região abdominal. *S. surinama* ocorre por representativa extensão na América do Sul. Esta espécie forma ninhos em troncos de árvores. Indistintamente denominada “caba-tatu”, é assim vulgarmente denominada em atribuição ao formato arquitetônico das colônias, que se assemelha a um casco de tatu. O acúleo de *S. surinama* apresenta farpas que dificultam a retirada do ferrão, fenômeno conhecido como autonomia de ferroada. Esse é um artifício observado em espécies himenópteras altamente sociais e é um importante recurso para a defesa da colônia contra predadores vertebrados (Hermann, 1971).

III
OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar o papel dos mastoparanos na modulação da resposta imune humoral aos imunógenos da peçonha de vespas mediante ativação dos mastócitos.

3.2 Objetivos específicos:

- i)* Isolar e caracterizar os mastoparanos de *Synoeca surinama*;
- ii)* Sintetizar e purificar os peptídeos para os ensaios *in vitro*;
- iii)* Avaliar a degranulação de mastócitos deflagrada por mastoparanos;
- iv)* Averiguar a ativação dos fatores de transcrição NFκB e NFAT em mastócitos após incubação com mastoparanos;
- v)* Determinar a taxa de degradação dos mastoparanos desafiados pela ação enzimática do sobrenadante de mastócitos ativados.



MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Acetonitrila (J. T. Baker[®]). Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics). 4-metilpiperidina (Sigma). Dimetilformamida (Vetec). O-benzotriazo-N,N,N',N'-tetrametiluronio-haxafluorofostato (HBTU) (Peptides International). Diisopropiletilamina (Sigma). 1,2-etanodiol (Merck). Triisopropilsilano (Sigma). Tioanisol (Sigma). Derivados 9-fluorenilmetóxicarbonil de aminoácidos (Peptides International). Água ultrapura obtida em sistema de referência Milli-Q[®]. Éter diisopropílico (Vetec). Ácido trifluoroacético (Sigma). Calibrantes (Bruker Daltonics). Fenol (Sigma). Resinas rink-amide-MBHA (Peptides International). Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio (MTT) (Sigma). Tampão fosfato salino (PBS). Células RBL-2H3. Células P815. Placas de cultura. Coluna cromatográfica. Eagle Modificado por Dulbecco (DEMEM) (Gibco[®]). Soro fetal bovino (Gibco[®]). Antibiótico G418 (Geneticin[®]). DNP₄₈-HAS. Ionóforo de cálcio A23187 (Sigma). Tripsina. Solução salina balanceada de Hank (Gibco[®]). Hidróxido de sódio (NaOH). Cloreto de sódio (NaCl). Glicina. Ácido cítrico. Citrato de sódio. Anfotericina B (Life Technologies). Estreptomicina. Penicilina. Triton X-100. Composto 48/80 (Sigma). β -hexosaminidase. 4-nitrofenil,N-Acetil, β -D-glucosamida (NAG).

4.2 Captura de animais e extração da peçonha

Espécimes de *Synoecca surinama* foram coletados no município de Mimoso de Goiás (Goiás) por busca ativa sob licença n° 47061/1 concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio

Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). Foram coletados 150 espécimes em três ninhos distintos. A identificação dos animais foi realizada por Sidnei Mateus, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Os reservatórios de peçonha foram excisados com o auxílio de uma pinça e rapidamente transferidos para uma mistura acetonitrila/água deionizada (1:1, v:v) resfriada em banho de gelo, solução pela qual se extraiu o conteúdo proteico do reservatório de peçonha após o rompimento da estrutura glandular mediante aplicação de uma leve pressão. A extração foi sucedida por centrifugação a 13148 g por 5 minutos, liofilização e armazenamento a 4°C.

4.3 Isolamento dos mastoparanos da peçonha de *Synoeca surinama*

Os procedimentos analíticos pertinentes à separação cromatográfica dos compostos aqui tratados foram procedidos em sistema HPLC Prominence (Shimadzu Corporation, Japão). A coluna cromatográfica analítica (Shim-pack Prep-ODS (H), C₁₈, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm, Shimadzu) foi condicionada com solvente B (acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético) e equilibrada com solvente A (ácido trifluoroacético aquoso 0,1% (v/v)) imediatamente antes da injeção da amostra no sistema. Cerca de 1 mg do extrato bruto da peçonha de *S. surinama* foi injetado na coluna. A eluição dos compostos foi efetuada mediante aplicação de gradiente linear crescente de solvente B, variando de 5% a 95% em 40 minutos, sob fluxo de 1 mL/min e monitoramento em 216 e 280 nm.

4.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF e o sequenciamento de peptídeos

As análises espectrométricas da peçonha ou das frações cromatográficas dela derivadas, bem como dos peptídeos sintéticos foram procedidas em espectrômetro de massa UltraFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram aplicadas

sobre uma placa de MALDI tipo maciça após serem misturadas na proporção 1:3 (v:v) com a solução matriz contendo 5 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, 50 µL de ácido trifluoroacético, 250 µL de acetonitrila e 200 µL de água ultrapura. Os espectros MS (faixa de massa: 700 Da - 3500 Da) e MS/MS foram adquiridos em modo refletido e positivo com calibração externa utilizando o *kit* de calibração padrão I (Bruker Daltonics, Germany). O sequenciamento *de novo* foi executado mediante a interpretação manual dos espectros MS/MS adquiridos no modo LIFT™ em software FlexAnalysis (versão 3.0, Bruker Daltonics, Alemanha). A estrutura primária dos peptídeos foi confirmada por sequenciamento N-terminal utilizando química de Edman em sequenciador automático PPSQ-23 (Shimadzu Co., Japão). O procedimento foi executado de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Síntese e purificação dos peptídeos

Os peptídeos – mastoparanos de *S. surinama* (SynS MP I e SynS MP II) e outros peptídeos da literatura (PolR MP II (LNFKALAALAKKIL-NH₂) (Murata *et al.*, 2006), EumR (LNLKGIFFKVASLLT) (Konno *et al.*, 2006), OpiM (ILGKIWEGIKSLF-NH₂) (Dai *et al.*, 2001), SubP (RPKPQQFFGLM-NH₂) (Wong & Jeng, 1994)) – foram sintetizados de acordo com a técnica de síntese em fase sólida adaptada de Merrifield (1963). Os peptídeos amidados e não-amidados foram sintetizados mediante o uso das resinas Rink-amide MBHA (Peptides International®, 200-400 Mesh, grau de substituição 0,37 meq/g) e Wang T (Peptides International®, 200-400 Mesh, grau de substituição 0,59 meq/g), respectivamente. Derivados ativados de aminoácidos f-Moc foram utilizados para a síntese. Após a síntese, os peptídeos foram removidos das resinas mediante clivagem ácida em mistura de ácido trifluoroacético (9,4 mL), água (500 µL) e triisopropilsilano (250 µL). Foram adicionados à solução de clivagem 500 µL de tioanisol, 500 mg de fenol e 250 µL de 1,2-etanodiol para a remoção de

peptídeos contendo triptofano em suas respectivas estruturas. Os extratos totais de síntese dos peptídeos sintéticos foram filtrados em filtro de Buchner n° 3, sob vácuo, e liofilizados, e em seguida purificados mediante injeção de suas respectivas soluções aquosas em coluna preparativa de fase reversa (Shim-pack Prep-ODS H Kit, C₁₈, 250 mm × 22 mm, 5 µm, Shimadzu) acoplada a sistema HPLC Prominence (Shimadzu Corporation, Japão). Os peptídeos foram eluídos por aplicação de gradiente linear de acetonitrila variando de 5-95% em 60 minutos sob fluxo constante de 10 mL/min à temperatura ambiente. A eluição dos peptídeos foi monitorada pela absorção de luz UV (216 e 280 nm) pelo eluato e as frações cromatográficas foram coletadas manualmente. A fim de se avaliar o grau de homogeneidade dos peptídeos, uma alíquota de 10 µL de suas respectivas soluções aquosas (30 µM) foi injetada em coluna analítica de fase reversa (Shim-pack XR-ODS, C₁₈, 50 mm × 2 mm, 2,8 µm, Shimadzu) acoplada a sistema cromatográfico UFLC Prominence (Shimadzu Corporation, Japan). As frações coletadas foram posteriormente analisadas por espectrometria de massa. A predominância quantitativa dos peptídeos foi obtido mediante integração das áreas abaixo da curva utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab, Wellesley Hills, MA).

4.6 Ensaio de viabilidade celular

O efeito dos peptídeos sobre a viabilidade de mastócitos RBL-2H3 foi investigado pelo ensaio de MTT em placas de 96 poços. 3×10^3 células foram transferidas para cada poço e incubadas a 37°C por 12 horas em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com 100 µL de Eagle Modificado por Dulbecco* (DEMEM*) contendo os peptídeos nas concentrações de 1 µM e 7,5 µM a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Foram utilizados como controles

* DEMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino.

experimentais DEMEM* e Triton X-100 (a 1% em DEMEM*). Após 30 minutos de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas a 37°C por 3 horas com MTT (0,05 mg/mL). 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço e uma hora mais tarde a absorbância foi medida a 595 nm. O ensaio de viabilidade foi realizado em triplicata e em duplicata para os peptídeos nas concentrações 7,5 µM e 1 µM, respectivamente.

4.7 Ensaio de liberação de β-hexosaminidase

O ensaio de degranulação foi realizado em células da linhagem P815 derivadas de mastocitoma de camundongos, segundo metodologia adaptada de Hide *et al.* (1993), avaliando a liberação de atividade de β-hexosaminidase. As células (1×10^4 por poço) foram incubadas em placas de 6 poços (Costar, Corning Incorporated) em DEMEM* por 12 horas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 200 g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* celular foi ressuspenso e incubado com 100 µL de tampão de Tyrode ou com o estímulo apropriado solubilizado em tampão de Tyrode por 30 min a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Alguns peptídeos foram testados a 1 µM, enquanto outros também o foram a 7,5 µM. Ionóforo de cálcio A23187 (0,5 µM) e composto 48/80 (10 µM) (ambos adquiridos da Sigma Aldrich, St. Louis, MO) foram utilizados como controle positivo. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 1200 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para uma microplaca de 96 poços. O *pellet* celular foi incubado com 100 µL de Triton X-100 (1%) por 5 min. O somatório de atividade do sobrenadante e do *pellet* solubilizado foi tomado como a atividade total, a partir da qual o percentil de atividade de β-hexosaminidase foi

* DEMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, contendo mistura antibiótica/antimicótica de 100 unidade/mL de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Life Technologies, Carlsbad, CA).

calculado. Para a mensuração da atividade de β -hexosaminidase, 25 μ L de sobrenadante e 25 μ L do lisado celular foram separadamente incubados com 25 μ L de NAG (0,0025 g/mL) em tampão citrato** (pH 3,5) por 60 min. A reação foi interrompida mediante a adição de 50 μ L tampão de glicina*** (pH 10,5) e a absorbância foi medida a 405 nm. Três experimentos independentes foram conduzidos a fim de se obter a média e o erro padrão.

4.8 Análise da degradação diferencial dos mastoparanos

Os mediadores liberados de 1×10^6 células RBL-2H3 foram obtidos mediante incubação das células com ionóforo de cálcio A23187 0,8 μ M solução salina balanceada de Hank (Life Technologies) por 15 minutos, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Os peptídeos a 30 μ M foram incubados com 100 μ L de solução contendo os mediadores liberados dos mastócitos por 2,5 horas a 37°C. Alíquotas de 15 μ L das amostras foram injetadas em coluna analítica (Shim-pack XR-ODS, C₁₈, 50 mm \times 2 mm, 2,8 μ m, Shimadzu) acoplada a sistema cromatográfico UFLC Prominence (Shimadzu Corporation, Japão). As frações coletadas manualmente foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF conforme descrito anteriormente. Alíquotas de 15 μ L dos peptídeos em solução salina balanceada de Hank a 30 μ M foram submetidas ao mesmo procedimento e usadas como padrão. A área abaixo da curva dos picos foi integrada usando o software Origin 8.0 a fim de se determinar a extensão da hidrólise dos peptídeos. Dois experimentos independentes foram realizados para a obtenção da média e de um desvio padrão da média.

** 37 mL de ácido cítrico 0,1 M e 13 mL de citrato de sódio 0,1 M.

*** 0,375 g de glicina, 0,292 g de NaCl, 500 μ L de NaOH 10 M e 24,5 mL de água.

4.9 Avaliação da ativação de fatores de transcrição

A ativação de NFAT e NFκB pelos mastoparanos foi investigada por meio do uso das linhagens celulares repórteres VB9 e NFκB2, respectivamente. As células foram cultivadas em frascos de cultura T75 com DEMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino e 0,4 mg/mL do antibiótico G418. As células foram incubadas com os mastoparanos a 1 μM e 7,5 μM por 60 min a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Células estimuladas com DNP₄₈-HAS (NFκB2) e ionóforo de cálcio (NFκB2 e VB9) foram utilizadas como controle positivo e células incubadas apenas com meio de cultura como controle negativo. Após 16 h, as células VB9 foram tripsinizadas e centrifugadas a 200 g por 5 min. As células NFκB2 foram tripsinizadas após 5 h de incubação com os peptídeos. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em PBS para análise. A expressão de proteína verde fluorescente (GFP) nas células repórteres foi avaliada por citometria de fluxo (Guava Technologies, Hayward, CA, EUA) e interpretada como índice de ativação dos respectivos fatores de transcrição.

4.11 Análise estatísticas

A análise estatística descritiva dos resultados foi realizada por meio do uso do Excel (Microsoft) e, nos casos em que se fez necessário, o teste de Tukey foi aplicado pela análise de variância ANOVA, por meio do uso do software PAST (Hammer *et al.*, 2001), para verificação da possível significância estatística das diferenças observadas.

RESULTADOS

5.1 Caracterização dos mastoparanos de *Synoeca surinama*

O fracionamento cromatográfico da peçonha de *Synoeca surinama* em coluna analítica de fase reversa (Figura 2) permitiu a identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF em modo refletido e positivo (MS) de dois peptídeos amidados co-eluídos em acetonitrila a 63% (Figura 3A). A elucidação das estruturas primárias dessas moléculas a partir dos íons fragmentados por MS/MS revelou dois tetradecapeptídeos cujas estruturas se distinguem unicamente pela substituição de um resíduo de isoleucina por fenilalanina na posição 4 (Figura 3B e Figura 3C). As sequências completas foram confirmadas pelo sequenciamento utilizando química de Edman em sequenciador automático. Foi também registrada a glicação dos peptídeos SynS I (Dados não mostrados).

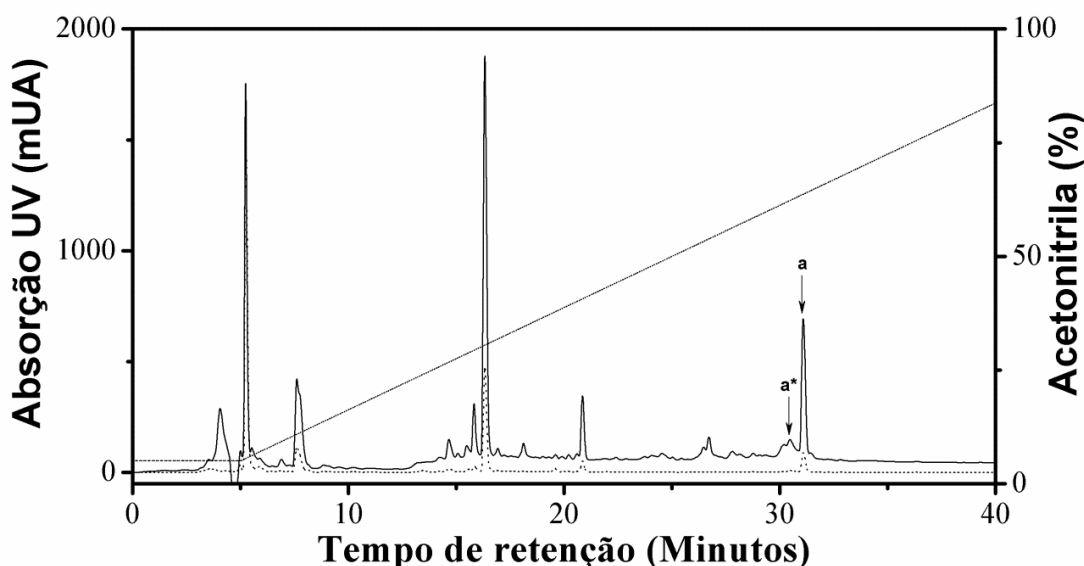


Figura 2 - Cromatograma referente à separação dos componentes da peçonha de *Synoeca surinama* em coluna de fase reversa mediante aplicação de gradiente linear de solvente B, variando de 5% a 95% em 40 minutos, sob fluxo de 1 mL/min e monitoramento em 216 (linha sólida) e 280 nm (linha pontilhada). **a** Mastoparanos SynS MP I e SynS MP II, co-eluídos em 31 minutos (63,66%). **a*** SynS MP I glicado, eluído em 30 minutos (62,27%).

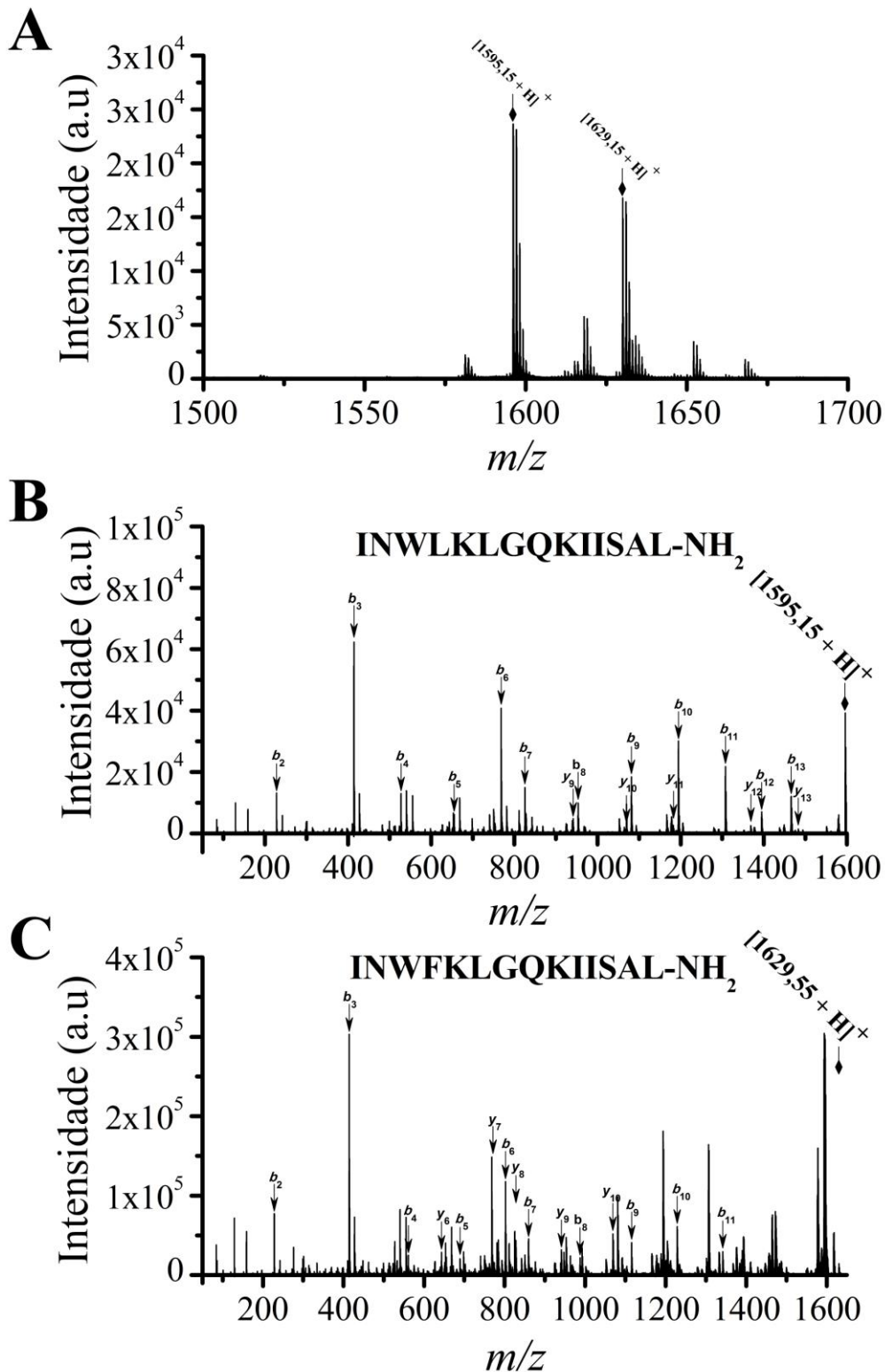


Figura 3 - Espectros MS (A) e MS/MS (B e C) dos tetradecapeptídeos da fração cromatográfica **a** da peçonha de *S. surinama* obtidos no modo refletido e LIFT, respectivamente. Sequenciamento *De novo* por interpretação manual dos espectros MS/MS dos peptídeos (B) SynS MP I, massa experimental 1595,1 Da e (C) SynS MP II, massa experimental 1629,5 Da. Ver apêndice A e B para identificar as massas das séries assinaladas dos gráficos B e C, respectivamente.

5.2 Síntese e purificação dos peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados e, em seguida, purificados. O grau de homogeneidade mínimo determinado por cromatografia analítica em sistema UFLC após a purificação foi de 95% (Apêndice C) e a avaliação do aspecto qualitativo da purificação dos peptídeos por espectrometria de massa MALDI-TOF não indicou a presença significativa de contaminantes (Dados não mostrados).

5.3 Viabilidade celular e liberação de β -hexosaminidase

A viabilidade celular dos mastócitos RBL-2H3 foi superior a 90% quando a concentração dos peptídeos utilizados no ensaio foi 1 μ M. A análise estatística da significância das diferenças observadas é inviável em virtude de o ensaio com os peptídeos a 1 μ M ter sido conduzido em duplicata (Figura 4A). Os peptídeos ensaiados a 1 μ M não induziram a ativação dos mastócitos da linhagem P815. O aumento da concentração de teste de SynS MP I e SynS MP II para 7,5 μ M foi suficiente para a verificação da liberação de cerca de 10% de atividade de β -hexosaminidase (*P < 0,05 e **P < 0,01) (Figura 4B).

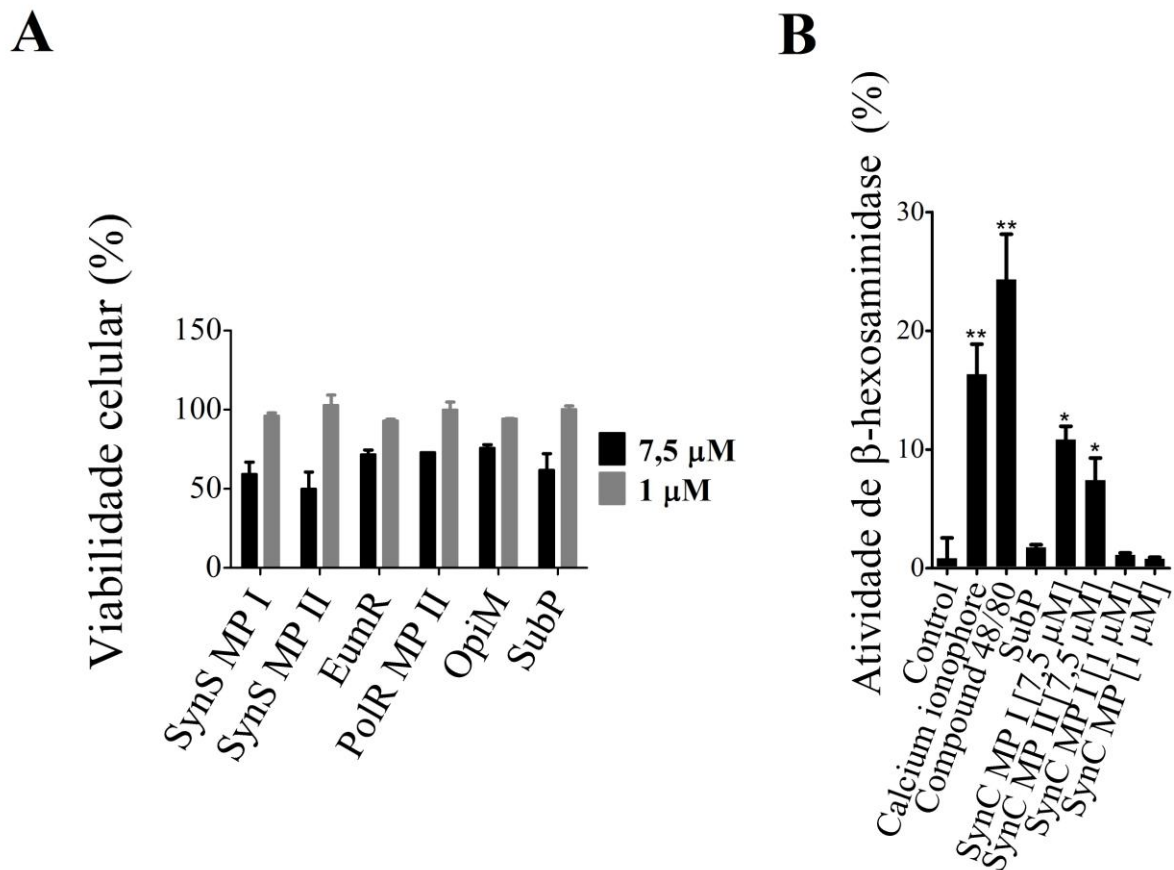


Figura 4 - (A) Viabilidade das células RBL-2H3 após incubação por 30 minutos com peptídeos em diferentes concentrações. Os valores da viabilidade celular representam a média de dois e três experimentos independentes quando as concentrações dos peptídeos foram 1 μM e 7,5 μM, respectivamente. **(B)** Degranulação relativa dos mastócitos expostos aos mastoparanos SynS MP I e SynS MP II. Os valores apresentados correspondem à média aritmética de três experimentos independentes ± DPM. O teste de Tukey foi usado para a verificação de diferenças estatisticamente significantes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.4 Ativação de NFκB e NFAT

Os peptídeos SynS MP I e SynS MP II isolados da peçonha de *S. surinama* promoveram a ativação de NFκB em mastócitos da linhagem repórter NFκB2 derivada da linhagem RBL-2H3. A expressão de GFP, decorrente da ativação de NFκB no modelo utilizado, foi flagrada em 11,87 % e 9,12 % das células quando estimuladas por SynS MP I 7,5 μM e SynS MP II 7,5 μM, respectivamente (Figura 5A). Não se observou diferenças estatisticamente significativas entre a ativação de NFκB elicitada por SynS MP I e SynS MP

II ($P > 0,05$). A redução da concentração dos peptídeos de $7,5 \mu\text{M}$ para $1 \mu\text{M}$ não foi acompanhada por significativa queda da expressão relativa de GFP ($P > 0,05$). A incubação dos mastócitos da linhagem repórter VB9 com os peptídeos a $1 \mu\text{M}$ não promoveu a ativação detectável de NFAT ($P > 0,05$) (Figura 5B).

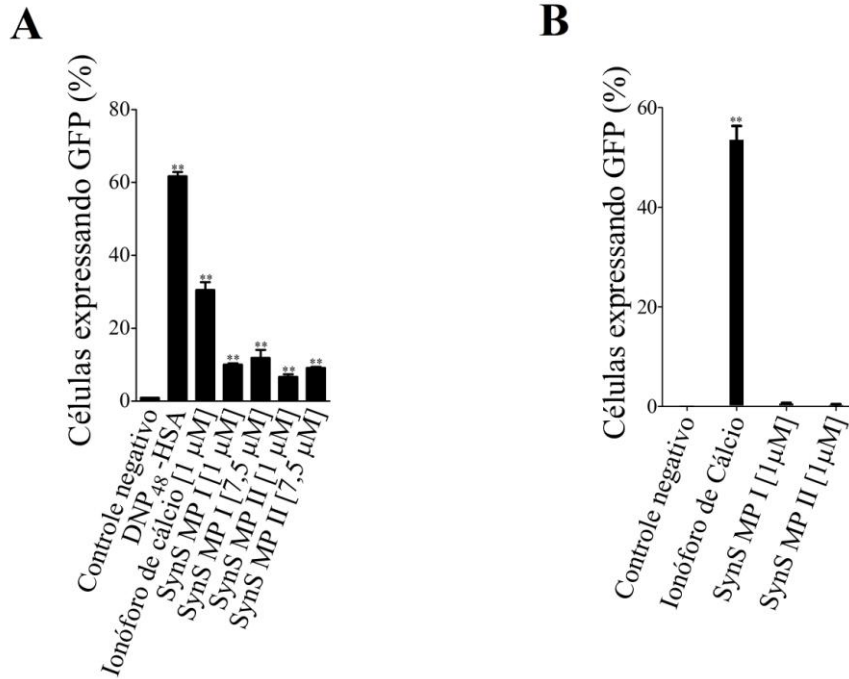


Figura 5 - Expressão relativa de proteína verde fluorescente em mastócitos (RBL-2H3 NF κ B2) como resultado da ativação de (A) NF κ B e (B) NFAT induzida pelos mastoparanos SynS MP I e SynS MP II. Os valores apresentados correspondem à média aritmética de três experimentos independentes \pm DPM. ** $p < 0.01$ (Teste de Tukey).

5.6 Análise da degradação diferencial dos mastoparanos

Após 2,5 h de incubação dos peptídeos a 30 μM com os mediadores liberados de mastócitos da linhagem RBL-2H3, foi observada a completa degradação de EumR e OpiM, enquanto 25,4 μM ($\pm 1,7$) de SynS MP I, 27,7 μM ($\pm 0,9$) de SynS MP II, 21,5 μM ($\pm 0,1$) de PolR MP II e 15,2 μM ($\pm 0,53$) de SubP foram hidrolisados (Figura 6).

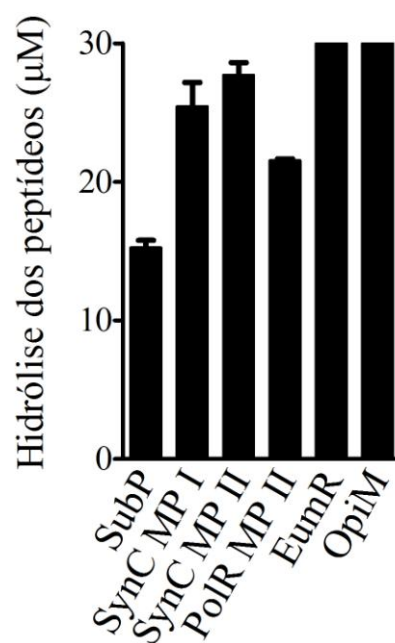


Figura 6 - Extensão da hidrólise dos peptídeos após incubação com mediadores liberados de mastócitos da linhagem RBL-2H3 após incubação com ionóforo de cálcio A23187 0,8 μM . Os experimentos foram conduzidos em duplicata tornando a análise estatística da significância das possíveis diferenças observadas inexecuível. Os valores apresentados correspondem à média aritmética (\pm DPM).

VS
DISCUSSÃO

O arranjo molecular da peçonha dos aculeatas como resultado das pressões ambientais próprias da história natural de cada espécie é uma mistura química complexa de largo espectro funcional. Entre aminas biogênicas (serotonina, histamina, tiramina, catecolamina) e outros compostos de natureza peptídica (peptídeos, enzimas), os mastoparanos apresentam elevada abundância relativa na peçonha de vespas sociais – a exemplo, os mastoparanos compõem aproximadamente 40% dos cerca de 260 µg da peçonha de vespas dos gêneros *Polistes* e *Dolicovespula* (Lai & Liu, 2010). Os mastoparanos são considerados secretagogos inespecíficos, caracterizados classicamente pela capacidade de induzir respostas exocíticas em mastócitos, bem como em outras células (Hirai, 1979; Higashijima, 1988).

A liberação de alguns mediadores pró-inflamatórios e imunomodulatórios estocados nos grânulos dos mastócitos, particularmente daqueles que perfazem o trajeto até os linfonodos em grânulos mais estáveis, está relacionada a eventos fundamentais no processo de imunização. A exemplo, alguns dos mediadores que são conduzidos em grânulos mais estáveis aos linfonodos promovem o remodelamento dos últimos, propiciando à elaboração das respostas imunes humorais inclusive (St. John *et al.*, 2012). Farquhar *et al.* (2002) demonstraram que os perfis de liberação de β -hexosaminidase e 5-hydroxitriptamina por mastócitos estimulados por diferentes estruturas quiméricas de mastoparanos se distinguem, sugerindo que as alterações estruturais promovidas no arcabouço molecular dos mastoparanos surtem efeito no âmbito dos mecanismos exocitóticos elicitados. O presente estudo apresenta a caracterização da estrutura primária de dois mastoparanos isolados da peçonha de *Synoeca surinama*, SynS MP I e SynS MP II, cujas sequências de aminoácidos divergem

apenas na posição 4, em que ocorre a substituição do resíduo de Leu em SynS MP I por Phe em SynS MP II.

Considerada a diversidade molecular natural dos mastoparanos, especulou-se que as alterações estruturais pudessem resultar na distinção da ação dos peptídeos. Para averiguar a validade dessa elucubração, investigou-se o caráter indutor de degranulação de SynS MP I e SynS MP II sintéticos por meio da avaliação da liberação de atividade de β -hexosaminidase de mastócitos da linhagem P815 após incubação com os peptídeos a 1 μ M e 7,5 μ M. Se ensaiados na menor concentração, não houve liberação detectável de β -hexosaminidase, fenômeno semelhante ao verificado para o mastoparano testado por Mizuno *et al.* (1998). Em se aumentando a concentração dos ensaios de 1 μ M para 7,5 μ M, observa-se a liberação de β -hexosaminidase. A essa concentração, os mastoparanos parecem já promover perturbações na membrana de modo a aumentar-lhe a permeabilidade, tanto que a liberação de mediadores pró-inflamatórios é acompanhada por um extravasamento proporcional de lactato desidrogenase (Mizuno *et al.*, 1998) e da diminuição da viabilidade celular. Esses dados da literatura são compatíveis com a fraca atividade indutora de degranulação observada para os mastoparanos SynS I MP e SynS MP II.

A atividade membranoativa dos mastoparanos, bem como de outros elementos da peçonha de vespas, é o mecanismo mais drástico de promoção da liberação dos componentes citoplasmáticos das células. A ação detergente desses peptídeos sobre a membrana de células epiteliais da região circunscrita à ferroadada pode promover o extravasamento de citocinas associadas à deflagração de respostas do tipo Th2 a alérgenos – a exemplo, as citocinas IL-25, IL-33 e lifopoietina do estroma tímico (Pulendran & Artis, 2012 *apud* Palm *et al.*, 2013). A IL-33 é uma citocina produzida constitutivamente em células epiteliais de barreira e imagina-se que seja liberada por células necróticas ou por células lisadas, bem como por mastócitos (Liew, 2012 *apud* Palm *et al.*, 2013). A ação de caráter autócrino/parácrino da IL-33 está

associada à indução da síntese de citocinas do tipo 2 por células Th2, além de ter sido demonstrado recentemente seu papel na ativação de células linfóides do grupo 2, produtoras de IL-5 e IL-13 (Walker e McKenzie, 2013 *apud* Palm *et al.*, 2013). O comprometimento da viabilidade celular após a incubação com os peptídeos em concentrações elevadas (conforme os resultados angariados por este trabalho, pelo menos igual 7,5 μ M) poderia sugerir um papel da ação membranoativa dos mastoparanos sobre mastócitos, e possivelmente sobre células epiteliais, na modulação da resposta imune por meio da liberação massiva de IL-33, entre outros mediadores. Contudo, os mastoparanos exibem mecanismos de ação semelhantes aos da melitina, cujo papel no estabelecimento de resposta Th2 não foi significante (Palm *et al.*, 2013).

A β -hexosaminidase é uma exoglicosidase que se co-localiza com outros mediadores pró-inflamatórios e imunomodulatórios em alguns grânulos exocíticos de mastócitos, sendo um importante marcador de degranulação (Schwartz, *et al.*, 1980; Fukuishi, *et al.*, 2014). A liberação dessa enzima induzida por SynS MP I e SynS MP II é um indicador da concomitante liberação de histamina, cuja influência sobre as subpopulações de células T auxiliares (Th1 e Th2) resulta na modulação das respostas imunes relacionadas ao estabelecimento de processos alérgicos e doenças autoimunes ao amplificar as respostas do tipo Th1 e regular negativamente respostas do tipo Th2 (Jutel, *et al.*, 2001). Apesar das indicações experimentais, a liberação de histamina induzida por SynS MP I e SynS MP II deve ser averiguada diretamente, dadas as divergências acerca da co-localização de histamina e de β -hexosaminidase em grânulos secretórios de mastócitos de camundongos e dos mecanismos já registrados, pelos quais os mastoparanos induzem a degranulação (Pure e Roche, 2008; Tiwari *et al.*, 2008; Mizuno *et al.*, 1998).

As proteases neutras estocadas nos grânulos secretórios dos mastócitos, ionicamente ligadas a proteoglicanas de Ser-glicina, correspondem a cerca da metade da massa de uma

única célula (Stevens & Adachi, 2007). A liberação dessas proteases para os microambientes circunvizinhos à ativação dos mastócitos, não raro simultânea à liberação de histamina e da β -hexosaminidase, está atrelada a diversos processos fisiopatológicos nos quais os mastócitos exercem diversas funções. O resultado mais relevante do *nocauteamento* da MCP-6 em camundongos, por exemplo, é a baixa dos níveis de IgE nos animais nocauteados quando em comparação com animais da linhagem selvagem, como consequência da queda dos níveis de expressão de citocinas típicas de respostas Th2 (Cui, 2010). A produção de IgE em células B de ratos é de modo semelhante afetada pela ausência da atividade enzimática de RMCP-I (protease I derivada de mastócitos de rato) liberada durante a degranulação (Yoshikawa, *et al.*, 2001). Nesse sentido, embora pouco intensa, a atividade degranuladora dos mastoparanos SynS MP I e SynS MP II pode ser um fator importante no balanço dos estímulos que coordenam a elaboração das respostas imunes aos componentes da peçonha.

A ativação dos mastócitos pode resultar na síntese *de novo* e na liberação de mediadores inflamatórios aos quais se imputa, entre outras funções, a promoção do recrutamento de outras células do sistema imune para o microambiente onde inicialmente ocorrera o estímulo. A transcrição gênica dos mediadores proteicos é desencadeada pela ativação de fatores de transcrição ubíquos no citoplasma após a deflagração devida das vias de sinalização. Os resultados obtidos utilizando linhagem NF κ B2, derivada de RBL-2H3, mostram que há ativação de NF κ B quando as células são estimuladas por SynS MP I e SynS MP II a 7,5 μ M. Os níveis de ativação observados não foram significativamente afetados face à redução da concentração dos peptídeos para 1 μ M, sugerindo alguma independência entre os mecanismos de ativação de NF κ B e de indução de degranulação. Considerando que a ativação do NF κ B em mastócitos está envolvida com a regulação da expressão de TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8 e interferon- γ (Siebenlist *et al.*, 1994; Jeong *et al.*, 2002), esses achados não corroboram a hipótese de uma atuação direta dos mastócitos sob influência

dos mastoparanos como agentes da polarização da resposta imune do tipo Th2 aos componentes da peçonha. A produção de interferon- γ inclusive é um fator preponderante ao favorecimento da configuração de resposta imune Th1 dado que esta citocina exerce regulação negativa sobre o desenvolvimento de linfócitos Th2 (Gereda *et al.*, 2000; Constant & Bottomly, 1997; Gali & Tsai, 2012). Os apontamentos contrários ao estabelecimento de uma resposta Th2 por influência da resposta dos mastócitos aos mastoparanos são reforçados pela não ativação do fator nuclear de linfócitos T ativados (NFAT) pelos mastoparanos SynS MP I ou SynS MP II nas condições testadas, visto que a ativação de NFAT está associada à produção das citocinas IL-4, IL-9, IL-13 e TNF- α (Monticelli *et al.*, 2004; Klein, *et al.*, 2006; Cui, Yue, 2010), perfil característico de respostas Th2.

Nos envenenamentos causados por animais peçonhentos, os componentes proteicos dos venenos são degradados pela carboxipeptidase A3, evento crucial na contenção de lesões locais e sistêmicas e, conseqüentemente, para redução da morbidade e mortalidade (Metz *et al.*, 2006). Os resultados da avaliação dos perfis de hidrólise dos mastoparanos pela atividade enzimática dos mediadores liberados de mastócitos da linhagem RBL-2H3 indicam que SynS MP I e SynS MP II podem perdurar no meio por pouco mais de 2,5 h. Resultados semelhantes foram encontrados para PolR MP II, enquanto EumR e OpiM foram completamente degradados no período de incubação. Naturalmente, a intensidade e o alcance das respostas dos mastócitos aos mastoparanos são determinantes para o balanço global da produção de citocinas e o direcionamento da resposta imune à peçonha e dependem, portanto, não só da potência da ação desses peptídeos, mas também, entre outros fatores, da capacidade intrínseca desses peptídeos de resistirem à decomposição enzimática após a degranulação.

VS
CONCLUSÃO

A peçonha de *Synoeca surinama* apresenta dois tetradecapeptídeos pertencentes à família dos mastoparanos, aqui denominados SynS MP I e SynS MP II, cujas características indutoras da degranulação de mastócitos foram confirmadas. O perfil de resposta exibido pelos mastócitos em razão da incubação com os mastoparanos SynS MP I e SynS MP II nas condições testadas não sugere a participação desses peptídeos como elementos precípuos à configuração de resposta imune tipo II, bem como à produção de IgE contra os imunógenos da peçonha. Ainda no tocante ao papel dos mastoparanos no estabelecimento de respostas humorais aos imunógenos, esses peptídeos parecem contribuir, por meio da ativação de fatores de transcrição de mastócitos envolvidos com a produção de citocinas que podem ser associadas a uma polarização do tipo Th1 da resposta imune. Assim, por meio de qual(is) mecanismo(s) os mastoparanos induzem respostas imunes resultantes na produção de IgE? Ainda, os estudos vindouros nessa linha de investigação devem se concentrar na determinação das características das respostas imunes induzidas *in vivo* pela peçonha de *Synoeca surinama*, com enfoque no impacto da ausência dos mastoparanos sobre a resposta imune ao envenenamento.

REFERÊNCIAS

- Abraham, S. N.; John, A. L. St. 2010. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 10, pp. 440–452.
- Argiolas, A.; Pisano, J. J. 1983. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *The Journal of biological chemistry*, 258, pp. 13697–13702.
- Asthana, N.; Yadav, S. P.; Ghosh, J. K. 2004. Dissection of Antibacterial and Toxic Activity of Melittin: A Leucine Zipper Motif Plays a Crucial Role in Determining its Hemolytic Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, pp. 55042–55050.
- Austin, A. D.; Downton, M. (Eds). Hymenoptera: evolution, biodiversity and biological control. *CSRIO Publishing*, Victoria, Austrália. 2000.
- Bischoff, S. C. 2007. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews Immunology*, 7, pp. 93–104.
- Bhoola, K. D.; Calle, J. D.; Schachter, M. 1961. Identification of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, histamine and a new kinin in a hornet venom (*V. Cabro*). *Journal of Physiology*, 159, pp. 167–182.
- Cavagnol, R M. 1977. The pharmacologic effects of hymenoptera venoms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 17, pp. 479–498.
- Cocchiara, R.; Bongiovanni, A.; Albegiani, G.; Azzolina, A.; Geraci, D. 1997. Substance P selectively activates TNF-alpha mRNA in rat uterine immune cells: a neuroimmune link. *Neuroreport*, 8, pp. 2961–2964.

- Connor, T. M.; O'Connell, J.; O'Brien, D. I.; Goode, T.; Bredin, C. P.; Shanahan, F. 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of cellular Physiology*, 201, pp. 167–180.
- Constant, S. L.; Bottomly, K. 1997. Induction of TH1 and TH2 CD4⁺ T Cell responses: the alternative approaches. *Annual reviews of Immunology*, 15, pp. 297–322.
- Costa, H.; Palma, M. S. 2000. Agelotoxin: a phospholipase A 2 from the venom of the neotropical social wasp *cassununga* (*Agelaia pallipes pallipes*). *Toxicon*, 38, pp. 1367–1379.
- Cui, Y. The role of mouse mast cell protease 6 (mMCP-6) in a model of allergic airway inflammation. 2010. 23 folhas. Dissertação – Uppsala Universitet.
- Diamaline, R. 1988. Post-translational modification of peptide messengers in the gut. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, volume 73, pp. 873–902.
- Ewan, P. W. 1998. Venom allergy. *British Medical Journal*, 316, pp. 1365–1368.
- Farquhar, M.; Soomets, U.; Bates, R. L.; Martin, A.; Langel, U.; Howl, J.; 2002. Novel mastoparan analogs induce differential secretion from mast cells. *Chemistry and Biology*, 9, pp. 63–70.
- Fernández, F.; Sharkey, M. (Eds). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. *Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá, Colombia. 2006.
- Finkelman, F. D. 2007. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *Journal of Allergy and Clinical immunology*, 3, pp. 506–515.
- Fitzgerald, K. T.; Flood, A. A. 2006. Hymenoptera stings. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21, pp. 194–204.

- Footitt, R.; Adler, P. (Eds). Insect Biodiversity: Science and Society. *Blackwell Publishing LTDA*, United Kingdom. 2009.
- Fukuishi, N.; Murakami, S.; Ohno, A.; Yamanaka, N.; Matsui, N.; Fukutsuji, K.; Yamada, S.; Itoh, K.; Akagi, M. 2014. Does β -hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of β -hexosaminidase in mast cell granules. *The Journal of Immunology*, 193, pp. 1886–1894.
- Gali, S. J.; Tsai, M. 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 5, pp. 693–704.
- Gaston, K. J. 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology*, 5, pp. 283–296.
- Gereda, J. E.; Leung, D. Y. M.; Thatayatikom, A.; Streib, J. E.; Price, M. R.; Klinnert, M. D.; Liu, A. H. 2000. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet*, 355, pp. 1680–1683.
- Ghildyal, N.; McNeil, H. P.; Gurish, M. F.; Austen, K. F.; Stevens, R. L. 1992. Transcriptional regulation of the mucosal mast cell-specific protease gene, MMCP-2, by interleukin 10 and interleukin 3. *Journal of Biological Chemistry*, 267, pp. 8473–8477.
- Ghosh, J. B.; Roy, M.; Bala, A. K. 2009. Delayed onset interstitial nephritis following multiple wasp stings. *Indian Journal of Nephrology*, 2, pp. 71–73.
- Gomes, F.; Noll, F. B. 2009. Diversity of social wasps: (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) in three fragments of semideciduous seasonal. *Revista Brasileira de Entomologia*, volume 53, pp. 428–431.
- Grimaldi, D.; M. S. Engel. Evolution of the insects. *Cambridge University Press*, United States of America. 2005.

- Grissel, E. E. 1999. Hymenopteran biodiversity: Some alien notions. *American Entomologist*, 45, pp. 235–44.
- Grodzki, A. C. G.; Moon, K. D.; Berenstein, E. H.; Siraganian, R. P. 2009. FcεRI-induced activation by low antigen concentrations results in nuclear signals in absence of degranulation. *Molecular Immunology*, 46, pp. 2539–2547.
- Guillot, S; Moreau, S. J. M. 2005. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, pp. 1209–1223.
- Gutierrez, D. A.; Rodewald, H. 2013. A sting in the tale of Th2 immunity. *Immunity*, 39, pp. 803–805.
- Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science*, volume 117, pp. 314–322.
- Hammer, O.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. 2001. PAST: paleontological statistic software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 1, pp. 1–9.
- Hermann, H. R. 1971. Sting autonomy: a defensive mechanism in certain social Hymenoptera. *Insect Sociaux*, 2, pp. 111–120.
- Hirai, Y.; Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T.; Fujino, M.; Kitada, C. 1979. A new mast cell degranulating peptide mastoparan in the venom of *Vespula lewisii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27, pp. 1942–1944.
- Ho, C.L.; Ko, J.L. 1988. Purification and characterization of a lethal protein with phospholipase A1 activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, 963, pp. 414–422.

- Ho, C. L.; Hwang, L. L.; Lin, Y. L.; Chen, C. T.; Yu, H. M.; Wang, K. T. 1994. Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requirements. *European Journal of Pharmacology*, 259, pp. 259–264.
- Hoffman, D. R. 2006. Hymenoptera Venom Allergens. *Clinical reviews in allergy and immunology*, 30, pp. 109–128.
- Hunt J.H.; Jeanne, R. L.; Keeping, M. B. 1995. Observations on *Apoica pallens*, a nocturnal Neotropical social wasp (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae, Epiponini). *Insectes Sociaux Journal*, 42, pp. 223–236.
- Jeong, H.; Koo, H.; Na, H.; Kim, M.; Hong, S.; Eom, J.; Kim, K.; Shin, T.; Kim, H. 2002. Inhibition of TNF- α and IL-6 production by aucubin through blockade of NF- κ B activation in RBL-2H3 mast cells. *Cytokine*, 5, pp. 252–259.
- Judd, T. M. 1998: Defensive behavior of colonies of the paper wasp, *Polistes fuscatus*, against vertebrate predators over the colony cycle. *Insectes Sociaux Journal*, 45, pp. 197–208.
- Jutel, M.; Watanabe, T.; Klunker, S.; Akdis, M.; Thomet, O. A. R.; Malolepszy, J.; Zak-Nejmark, T.; Koga, R.; Kobayashy, T.; Blaser, K.; Akdis, C. A. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*, 27, pp. 420–425.
- Kawakami, T. & Galli, S. 2002. Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology*, 2, pp. 773–786.
- King, T. P.; Jim, S. Y.; Wittkowski, K. M. 2003. Inflammatory role of two venom componentes of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): a mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131, pp. 25–32.

- Klein, M.; Klein-Hessling, S.; Palmetshofer, A.; Serfling, E.; Tertlit, C.; Bopp, T.; Heib, V.; Becker, M.; Taube, C.; Schild, H.; Schmitt, E.; Stassen, M. 2006. Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *Journal of Immunology*, 177, pp. 6667–6674.
- Konno, K.; Hisada, M.; Naoki, H.; Itagaki, Y.; Kawai, N.; Miwa, A.; Yasuhara, T.; Morimoto, Y.; Nakata, Y. 2000. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*, 38, pp.1505–1515.
- Laddha, G. P.; Vidyasagar, G.; Bavaskar, S. R.; Baile, S. B.; Suralkar, S. S. 2012. Serotonin: a driver of pleasure and misery. *Der Pharmacia Lettre*, 4, pp. 443–455.
- Lai, R.; Liu, C. Bioactive peptides and proteins from wasp venoms. em: Toxins and hemostasis: from bench to bedside. *Springer*, 2010, New York, USA.
- Langer, J. 1897. Über das Gift unserer Honigbiene. *Arch. Exp. Path. Pharmak. Leipz.*, 38, pp. 381–396.
- Leluk, J.; Schmidt, J.; Jones, D. 1989. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon*, 27, pp. 105–114.
- Lu, Li-Fan; Lind, E. F.; Gondek, D. C.; Bennett, K.; Gleeson, M. W.; Pino-Lagos, K.; Scott, Z.; Coyle, A. J.; Reed, J. L.; Van Snick, J.; Strom, T. B.; Zheng, X. X.; Noelle, R. J. 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, 442, 997–1002.
- Marceau, F.; Hess, J. F.; Bachvarov, D. R. 1998. The B1 receptors for kinins. *Pharmacological Reviews*, 3, pp. 357–386.

- Mason, W. R. M.; Huber, J. T. Order Hymenoptera. Em: Goulet, H.; Huber, J. T. Hymenoptera of the world: an identification guide families. *Agriculture Canada*, Canada. 1993.
- Matsuura, M. Vespa and Provespa. Em: Ross, K. G.; Matthews, R. W. (Eds.). The Social Biology of Wasps. *Cornell University Press*, New York, United States of America. 1991.
- Mendes, M. A.; Souza, B. M.; Marques, M. R.; Palma, M. S. 2004. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon*, 44, pp. 67–74.
- Metz, M.; Piliponsky, A. M.; Chen, Ching-Cheng; Lammel, V.; Abrink, M.; Pejler, G.; Tsai, M. Galli, S. J. 2006. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, 313, pp. 526–530.
- Metz, M.; Siebenhaar, F.; Maurer, M. 2008. Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiology*, 213, pp. 251–260.
- Monticelli, S.; Solymar, D. C.; Rao, A. 2004. Role of NFAT proteins in IL-13 gene transcription in mast cells. *Journal of Biology and Biochemistry*, 279, pp. 36210–36218.
- Mousli, M.; Brenner, C.; Landry, Y.; Bockaert, J.; Rouot, B. 1990. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. *Federal of Eropean Bichemical Societies*, 259, pp. 260–262.
- Nakajima, T.; Yasuhara, T.; Uzu, S.; Wakamatsu, K; Miyazawa, T.; Fukuda, K; Tsukamoto, Y. 1985. Wasp venom peptides: Wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical Properties. *Peptides*, 6, pp. 425–430.
- Nakajima, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. Em: Piek, T. Venom of Hymenoptera, *Academic Press*, United States of America. 1986.

- Okano, Y.; Takagi, H.; Tohmatsu, T.; Nakashima, S.; Kuroda, Y.; Saitof, K.; Nozawa, Y. 1985. A wasp venom mastoparan-induced polyphosphoinositide breakdown in rat peritoneal mast cells. *Federal of European Biochemical Societies*, 188, pp. 363–366.
- Ortiz, G. M.; Camargo, M. I. 2006. Venom gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae). Ultrastructural characterization. *Micron*, 37, pp. 243–248.
- Palm, N. W.; Rosenstein, R. K.; Yu, S.; Schenten, D. D.; Florsheim, E. 2013. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity*, 39, 976–985.
- Palma, M. S. Insect venom peptides. Em: *The Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier, United States of America. 2006.
- Peng, S. L.; Szabo, S. J.; Glimcher, L. H. 2002. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, pp. 5545–5550.
- Pure, N.; Roche, P. A. 2008. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7, pp. 2580–2585.
- Redegeld, F. A.; van der Heidjen, M. W.; Kool, M.; Heijdra, B. M.; Garssen, J.; Kraneveld, A. D.; van Loveren, H.; Roholl, P.; Saito, T.; Verbeek, J. S.; Claassens, J.; Koster, A. S.; Nijkamp, F. P. 2002. Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses. *Nature Medicine*, 8, pp. 694–701.
- Rivera, J.; Gilfillan, A. M. 2006. Molecular regulation of mast cell activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, pp. 1214–1225.

- Santos, L. D.; Pieroni, M.; Menegasso, A. R. S.; Pinto, J. R. A. S.; Palma, M. S. 2011. A new scenario of bioprospecting of hymenoptera venoms through proteomic approaches. *The Journal of Animals and Toxins Including Tropical Disease*, 4, pp. 364–377.
- Scott, D. L.; Otwinowski, Z; Gelb, M. H.; Singler, P. B. 1990. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science*, 250, pp. 1563–1566.
- Schmidt, J. O. 1982. Biochemistry of insect venoms. *Annual Reviews Entomology*, 27, pp. 339–368.
- Schmitz, J., Moritz, R. F. A. 1998. Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 9, pp. 183–191.
- Schremmer, F. 1972. Beobachtungen zur Biologie von *Apoica pallida* (Olivier, 1791), einer neotropischen sozialen Faltenwespe (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux Journal*, 19, pp. 343–357.
- Siebenlist, U.; Franzoso, G.; Brown, Keith. 1994. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annual Reviews of Cell Biology*, 10, pp. 405–455.
- Silva, E. C. Caracterização de toxinas presentes em peçonhas de vespas. Dissertação (Mestrado). 2003. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.
- Song, Dong-Li; Chang, Geen-Dong; Ho, Chewn-Lang; Chang, Chung-Ho. 1993. Structural requirements of mastoparan for activation of membrane-bound guanylate cyclase. *European journal of pharmacology*, 247, pp. 283–288.
- Spiegelberg, H. L. 1990. The Role of Interleukin-4 in IgE and IgG Subclass Formation. *Seminars in Immunopathology*, 12, pp. 365–383.

- St. John, A. L.; Chan, C. Y.; Staats, H. F.; Leong, K. W.; Abraham, S. N. 2012. Synthetic mast cells granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes. *Nature Materials*, 1, pp. 1–8.
- Stevens, R. L.; Aldachi, R. 2007. Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their B-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunological Reviews*, 217, pg. 155–167.
- Stork, N. E. Measuring global biodiversity and its decline. Em: Biodiversity II: Understanding and Protecting our Biological Resources. *Joseph Henry Press*, United States of America. 1996.
- Strait, R. T.; Morris, S. C.; Yang, M.; Qu, X.; Finkelman, F. D. 2002. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 4, pp. 658–668.
- Strait, R. T.; Morris, S. C.; Finkelman, F. D. 2006. IgG blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis *in vivo* through both antigen interception and FcγRIIb cross-link. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, pp. 833–841.
- Tiwari, N.; Wang, C.; Brochetta, C.; Ke, G.; Vita, F.; Qi, Z.; Rivera, J.; Soranzo, M. R.; Zabucchi, G.; Hong, W.; Blank, U. 2008. VAMP-8 segregates mast cell preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood*, 7, pp. 3665–3674.
- Tomé, S.; Reis, G.; Guedes, M.; Saraiva, L.; Teixeira, F.. 2009. Imunoterapia com veneno de himenópteros: a experiência de uma consulta. *Acta Pediatrica Portuguesa*, 40, pp. 30–32.
- Toru, H.; Eguchi, M.; Matsumoto, R.; Yanagida, M.; Yata, J.; Nakahata, T. 1998. Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood*, 91, pp. 187–195.

- Turillazzi, S; Mastrobuoni, G; Dani, F. R.; Moneti, G; Pieraccini, G; la Marca, G; Bartolucci, G; Perito, B; Lambardi, D; Cavallini, V; Dapporto, L. 2006. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17, pp. 376–383.
- Turillazzi, S. 2006. Polistes venom: a multifunctional secretion. *Annales Zoologici Fennici*, 443, pp. 488–499.
- Vilhelmsen, L. 2001. Phylogeny and classification of the extant basal lineages of the Hymenoptera (Insecta). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 131, pp. 393–442.
- Yang, H.; Xu, X.; Ma, D.; Zhang, K.; Lai, R. 2008. A phospholipase A1 platelet activator from the wasp venom of *Vespa magnifica* (Smith). *Toxicon*, 51, pp. 289–296.
- Yoshikawa, T.; Imada, T.; Nakakubo, H.; Nakamura, N.; Naito, K. 2001. Rat mast cell protease-I enhances immunoglobulin E production by mouse B cells stimulated with interleukin-4. *Immunology*, 104, pp. 333–340.
- Zampeli, E.; Tiligada, E. 2009. The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *British Journal of Pharmacology*, 157, pp. 24–33.
- Wiese, H. Nova Apicultura. Em: Os produtos da abelha. *Editora Agropecuária*, Brasil. 1984.
- Wu, T.; Chou, T.; Ding, Y.; Li, M. 1999. Stimulation of TNF- α , IL-1 β and nitrite release from mouse cultured cells and lavaged peritoneal cells by mastoparan M. *Immunology and Cell Biology*, 77, pp. 476–482.

APÊNDICES

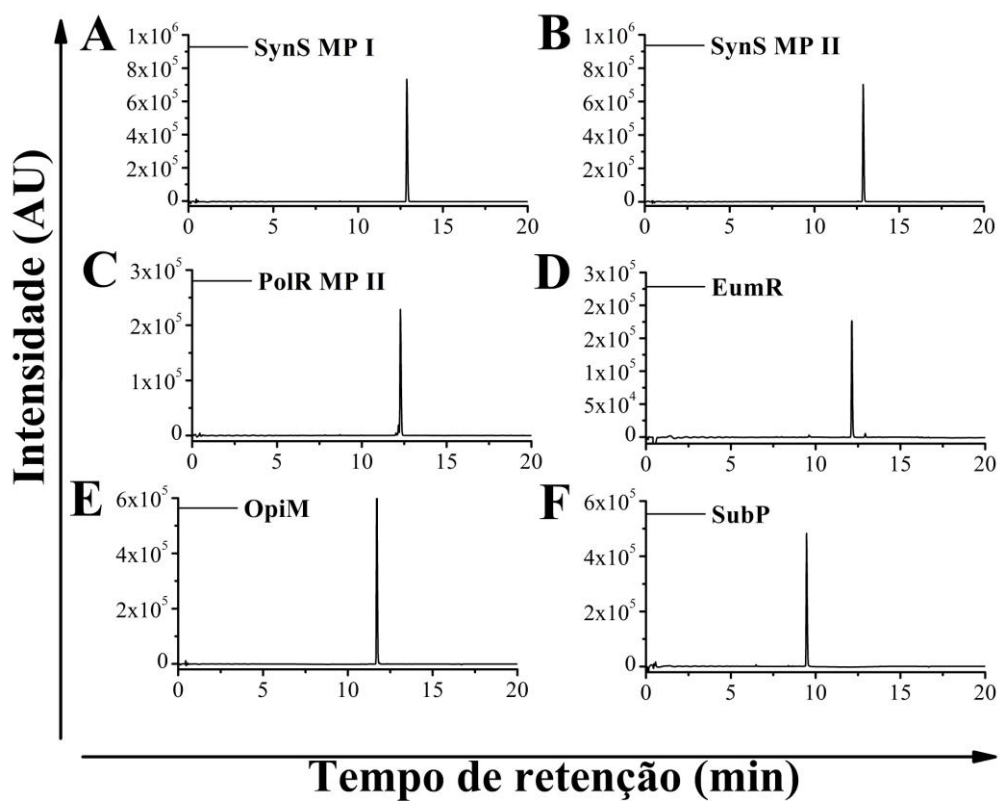
APÊNDICE A – Íons das séries b e y relativos à fragmentação do SynS MP I.

Série b		Série y		Imônios
b_1	-	y_{13}	1482,8	84,0
b_2	228,0	y_{12}	1368,7	129,0
b_3	414,1	y_{11}	1182,6	159,0
b_4	527,1	y_{10}	1069,5	
b_5	655,2	y_9	941,3	
b_6	768,5	y_8	828,3	
b_7	825,32	y_7	-	
b_8	953,3	y_6		
b_9	1081,4	y_5	-	
b_{10}	1194,5	y_4	-	
b_{11}	1307,7	y_3	-	
b_{12}	1394,7	y_2	-	
b_{13}	1465,8	y_1	-	

APÊNDICE B – Íons das séries b e y relativos à fragmentação do SynS MP II.

Série b		Série y		Imônios
b_1	-	y_{13}	-	84,0
b_2	228,0	y_{12}	-	129,0
b_3	414,1	y_{11}	-	159,0
b_4	561,1	y_{10}	1068,87	
b_5	689,2	y_9	940,96	
b_6	802,5	y_8	828,15	
b_7	859,32	y_7	771,35	
b_8	987,3	y_6	643,45	
b_9	1115,4	y_5	-	
b_{10}	1228,5	y_4	-	
b_{11}	1341,7	y_3	-	
b_{12}	1428,7	y_2	-	
b_{13}	1499,8	y_1	-	

APÊNDICE C – Cromatogramas obtidos em coluna analítica de fase reversa (C_{18}) dos peptídeos sintéticos após a purificação em coluna preparativa. Os peptídeos foram eluídos mediante aplicação de gradiente linear de acetonitrila de 5 a 95 % em 23 minutos, sob fluxo de 0,4 mL/min e monitorização em 215 nm. A quantificação de contaminantes de cada peptídeo foi realizada pela integração da área abaixo da curva e o grau máximo de contaminação averiguado foi de 5%.



ANEXOS

ANEXO A – Artigo.

Decoding the role of mastoparans as immunomodulators of humoral responses against immunogens from wasp venom

Cardozo Fh, José de Lima^{1,3}; Freitas Filho, Edismauro Garcia²; Prates, Maura Vianna³;
Oliver, Constance²; Jamur, Maria Célia²; Silva, Luciano Paulino^{1,3*}

¹ Departamento de Biologia Animal, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF.

² Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Keywords: *Synoeca surinama*, *mastoparans*, *anaphylaxis*, *mast cells*.

* Corresponding author to whom correspondence should be addressed: Laboratório de Espectrometria de Massa (Sala de Nanotecnologia), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Prédio da Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Final W5 Norte, Asa Norte Brasília-DF, CEP. 70770-917, Brazil. Tel. +55 61 34484794 e-mail: luciano.paulino@embrapa.br

Abstract

Mastoparans SynS MP I and SynS MP II currently isolated from venom glands of the Neotropical swarm-founding wasp *Synoeca surinama* were shown to be weak inducers of NF κ B activation in the cell line NF κ B2 derived from RBL-2H3 rat mast cells. Additionally, both the mastoparans were unable to activate NFAT in the cell line VB9 derived from RBL-2H3 rat mast cells, but could induce β -hexosaminidase release from P815 cells derived from a mouse mastocytoma. The response profile is not compatible with the suggestion that mastoparan could directly stimulate mast cells to mount a T_H2 response against immunogens from wasp venoms.

1 Introduction

Females from species belonging to *taxon* Aculeata (Hymenoptera), mainly social hymenopterans, are notable because of the fearful stings inflicted on their victims. Pharmacologic effects of Hymenoptera venoms range from local inflammatory responses to systemic reactions according to the biochemical composition of the venom and idiosyncratic characteristics of the victims (Cavagnol, 1977). Anaphylactic systemic reactions are the most severe reactions observed after wasp venomous injury. Most anaphylactic events in humans occur by the classic pathway although a few anaphylactic reactions using an alternative pathway have also been recorded (Finkelman, 2007; Marichal *et al.*, 2013).

The classic pathway of activation for systemic anaphylaxis is mediated by specific IgE bound to high-affinity receptors for IgE (FcεRI) on the surface of basophils and mast cells (Strait *et al.*, 2002; Strait *et al.*, 2006). IgE production against Hymenoptera venom allergens result in a type II immune response in which mast cells play a key role by releasing inflammatory mediators that influence naive T helper cells to differentiate to T_H2 cells. Interaction of T_H2 cells with B cells through the major histocompatibility complex, other co-stimulatory molecules and by secretion of IL-4 and IL-14 induces the class-switch of immunoglobulins to IgE (Yoshikawa, 2001; Gali & Tsai, 2012).

The low adjuvant activity in a humoral response against VesV 5, a mastoparan isolated from *Vespula vulgaris*, administered intraperitoneally and subcutaneously in BALB/c mice suggests the possibility of a type II immune response (King *et al.*, 2003). Aiming to investigate the role of mast cell responses initiated by mastoparans in modulating humoral responses to immunogens from wasp venoms, the present study evaluated mast cells degranulation and activation of the transcription factors NFκB and NFAT in mast cells after incubation with micromolar concentrations of mastoparans isolated from the venom of the neotropical social wasp *Synoeca surinama*.

2 Material and methods

2.1 Characterization of mastoparans from *Synoeca surinama* venom

Specimens of *S. surinama* were captured in Mimoso (Goiás, Brasil) by active search under IBAMA's license. Analytical reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed in order to fractionate and isolate the major peptides from venom. Purity confirmation and *de novo* sequencing were performed by manual interpretation of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) through MS and MS/MS spectra, respectively. The primary structures of the peptides were also confirmed by N-terminal sequencing using Edman chemistry. For further details see the supplementary data.

2.2 Peptide synthesis and purification

The peptides SynS MP I (present study), SynS MP II (present study), PolR MP II (Murata *et al.*, 2006), EumR (Konno *et al.*, 2006), OpiM (Dai *et al.*, 2001), SubP (Wong & Jeng, 1994) were synthesized by a solid phase technique adapted from Merrifield (1963) using Fmoc-amino acids. The degrees of homogeneity and primary structures of synthetic peptides were confirmed by RP-HPLC followed by MALDI-TOF MS analysis. For further details see the supplementary data.

2.3 Cellular viability assay and β -hexosaminidase assay

The effect of the peptides on the viability of RBL-2H3 mast cells was investigated by tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay while the induced degranulation was assessed by quantifying the activity of β -hexosaminidase released from P815 mastocytoma cells. For further details see the supplementary data.

2.4 Hydrolysis of mastoparans by enzymes released by mast cells

Mastoparans were incubated with the compounds released from RBL-2H3 cells stimulated for 15 minutes with calcium ionophore A23187. After 2.5 hours, the samples were

evaluated by RP-HPLC followed by MS analysis. For further details see the supplementary data.

2.5 Transcription factor activation

NFAT and NF κ B activation by wasp mastoparans was investigated by using the cell reporter lineages VB9 and NF κ B2, respectively. VB9 and NF κ B2 cells were trypsinized and centrifuged after 16 and 5 hours of incubation with the mastoparans, respectively. Pellets were resuspended and the green fluorescence protein expression was evaluated by flow cytometry. For further details see the supplementary data.

3 Results and discussion

The fractionating process of *S. surinama* crude venom resulted in the identification by MS of two peptides that co-eluted at 63% acetonitrile (Fig S1), showing [M+H] of 1595.1 Da and 1629.5 Da and called here SynS MP I and SynS MP II, respectively. The elucidation of their amino acid sequences by *de novo* sequencing (MS/MS) was further confirmed by Edman sequencing (data not shown) which showed amidated tetradecapeptides analogues to wasp mastoparans. Both peptide structures differed only by a single amino acid residue substitution of Leu and Phe observed in position 4 of the SynS MP I (INWLKLGQKIISAL-NH₂) and SynS MP II (INWFKLGQKIISAL-NH₂) peptides, respectively (Fig S2 A and B). Mastoparans SynS MP I, SynS MP II and other peptides from the literature were successfully synthesized as confirmed by MS (data not shown). Additionally, their purification by RP-HPLC resulted in a high level of homogeneity (more than 95%) (Fig S3).

The MTT assay showed that the viability of RBL-2H3 mast cells was 96.2% (\pm 1.5%), 102.8% (\pm 6.3%), 99.9% (\pm 4.7%), 93.1% (\pm 0.6%), 94.1% (\pm 0.1%) and 100.2% (\pm 2.1%) after incubation with 1 μ M of SynS MP I, SynS MP II, PolR MP II, EumR, OpiM or SubP, respectively (Fig S4). Increasing peptide concentrations to 7.5 μ M, led to a RBL-2H3 cell viability of 59.3% (\pm 7.6%), 50.0% (\pm 10.5%), 73.1% (\pm 0%), 71.6% (\pm 2.8%), 75.7% (\pm

2.0%) and 61.9% (\pm 10.2%) (Fig S4). Incubation of P815 mast cells with 7.5 μ M SynS MP I, induced the release of 10.8% (\pm 1.1%) of the total β -hexosaminidase activity while incubation with 7.5 μ M SynS MP II stimulated the release of 7.4% (\pm 1.8%) of the total β -hexosaminidase activity (Fig 1). No detectable release of β -hexosaminidase activity was observed when the assay was conducted with mastoparans. The same was found for PolR MP II, OpiM, EumR and SubP at 1 μ M (data not shown). β -hexosaminidase co-localizes with other preformed mediators in mast cell granules and is an important biomarker of degranulation (Schwartz & Austen, 1980; Fukuishi, *et al.*, 2014). Histamine release from mast cells normally occurs concomitantly with the release of β -hexosaminidase. Therefore β -hexosaminidase release induced by SynS MP I and SynS MP II is an indicator of histamine release. Histamine release on sub-populations of T helper cells can modulate the immune response in order to upregulate T_{H1} responses and downregulate T_{H2} responses (Jutel, *et al.*, 2001). Simultaneously with histamine release, released chymases may be related to the expression of cytokines associated with IgE synthesis (Yoshikawa, *et al.*, 2001).

Neutral proteases interacting with Ser-Gly proteoglycans in mast cell granules make up about half of the total mass of a single cell and participate in a wide range of pathophysiological processes (Stevens & Adachi, 2007). Carboxypeptidase A3 is crucial to the reduction of morbidity and mortality after bee stings by restricting local and systemic injuries (Metz *et al.*, 2006). This suggests that the intensity and the extent of the response depend on the resistance of the stimulating peptide to enzymatic degradation. In order to investigate the hydrolysis of mastoparan peptides by the enzymes, present in mast cell granules, degranulation was induced in RBL-2H3 mast cells and 30 μ M of the peptides were incubated with the released mediators. After incubation for 2.5 h, complete degradation of EumR and OpiM was observed while 25.4 μ M (\pm 1.7) of SynS MP I, 27.7 (\pm 0.9) 21.5 (\pm 0.1) of PolR MP II and 15.2 μ M (\pm 0.53) of SubP were hydrolyzed (Fig S5).

Mast cells activation results in the *de novo* synthesis of inflammatory and immunomodulatory mediators and their release are associated with the promotion of immune cells recruitment. Transcription of proteic mediators is initiated by activation of transcription factors in the cytoplasm. When NF κ B2 cells were stimulated with 7.5 μ M of SynS MP I or SynS MP II, 11.8 \pm 2.1% and 9.1 \pm 0.2% of the NF κ B2 cells respectively were activated (Fig 2A). When the concentration of the peptides was decreased to 1 μ M, the levels of activation were similar. At 1 μ M SynS MP I and SynS MP II induced 10 \pm 0.4% and 6.6 \pm 0.7% NF κ B2 cell activation, respectively. Activation of NF κ B in mast cells is related to the expression of TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8 and interferon- γ (Siebenlist *et al.*, 1994; Jeong *et al.*, 2002). Production of interferon- γ is a determinant factor in the polarization of the T_H1 response by negatively regulating T_H2 lymphocyte development (Gereda *et al.*, 2000; Constant & Bottomly, 1997; Gali & Tsai, 2012). No detectable activation of NFAT was observed when VB9 cells were incubated with 7.5 μ M of mastoparans from *S. surinama* (Fig 2B). NFAT is related to the production of IL-4, IL-9, IL-13 and TNF- α (Klein, *et al.*, 2006; Monticelli *et al.*, 2004). Therefore, these results strongly suggest that the adjuvant activity of mastoparans in humoral responses against immunogens from wasp venoms are not mediated by T_H2 responses induced by mast cells activated by these peptides.

Acknowledgments

We are thankful to Sidnei Mateus for wasp specie identification, Eder Barbosa for help to wasp specimens' collect and Anderson Roberto de Souza, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo for technical assistance. The authors thank the financial support and scholarships to this study by the Brazilian agencies CNPq, CAPES and Embrapa.

4 References

- Cavagnol, R M. 1977. The pharmacologic effects of hymenoptera venoms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 17, 479-498.
- Constant, S. L. & Bottomly, K. 1997. Induction of TH1 and TH2 CD4⁺ T Cell responses: the alternative approaches. *Annual Reviews of Immunology*, 15, 297-322.
- Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., Nakajima, T. 2001. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4, 820-825.
- Gali, S. J., Nakae, S., Tsai, M. 2005. Mast cell in the development of adaptative immune responses. *Nature Immunology*, 2, 135-142.
- Gali, S. J.; Tsai, M. 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 5, 693-704.
- Finkelman, F. D. 2007. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *Journal of Allergy and Clinical immunology*, 3, 506-515.
- Fukuishi, N., Murakami, S., Ohno, A., Yamanaka, N., Matsui, N., Fukutsuji, K., Yamada, S., Itoh, K., Akagi, M. 2014. Does β -hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of β -hexosaminidase in mast cell granules. *The Journal of Immunology*, 193, 1886-1894.
- Gereda, J. E., Leung, D. Y. M., Thatayatikom, A., Streib, J. E., Price, M. R., Klinnert, M. D., Liu, A. H. 2000. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet*, 355, 1680-1683.
- Jeong, H., Koo, H., Na, H., Kim, M., Hong, S., Eom, J., Kim, K., Shin, T., Kim, H. 2002. Inhibition of TNF- α and IL-6 production by aucubin through blockade of NF- κ B activation in RBL-2H3 mast cells. *Cytokine*, 5, 252-259.
- Jutel, M., Watanabe, T., Klunker, S., Akdis, M., Thomet, O. A. R., Malolepszy, J., Zak-Nejmark, T., Koga, R., Kobayashi, T., Blaser, K., Akdis, C. A. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*, 6854, 420-425.
- King, T. P., Jim, S. Y., Wittkowski, K. M. 2003. Inflammatory role of two venom componentes of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): a mast cell degranulating peptide

- mastoparan and phospholipase A1. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131, 25-32.
- Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmethofer, A., Serfling, E., Tertlit, C., Bopp, T., Heib, V., Becker, M., Taube, C., Schild, H., Schmitt, E., Stassen, M. 2006. Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *Journal of Immunology*, 177, 6667-6674.
- Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Fontana, R., Rangel, M., Oliveira, J. S., Cabrera, M. P., Neto, J. R., Hide, I., Nakata, Y., Yasuhara, T., Nakajima, T. 2006. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides*, 11, 2624-2631.
- Marichal, T., Starkl, P., Reber, L. L., Kalesnikoff, J., Oettgen, H., Tsai, M., Metz, M., Galli, S. J. 2013. A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity*, 39, 963-975.
- Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 2149-2154.
- Metz, M., Piliponsky, A. M., Chen, C., Lammer, V., Abrink, M., Pejler, G., Tsai, M., Galli, S. J. 2006. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, 311, 526-530.
- Monticelli, S., Solymar, D. C., Rao, A. 2004. Role of NFAT proteins in IL-13 gene transcription in mast cells. *Journal of Biology and Biochemistry*, 279, 36210-36218.
- Murata, K., Shinada, T., Ohfuné, Y., Hisada, M., Yasuda, A., Naoki, H., Nakajima, T. 2006. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 12, 2493-2497.
- Schwartz, L. B., Austen, K. F. 1980. Enzymes of mast cell granules. *The Journal of Investigative Dermatology*, 74, 349-353.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, Keith. 1994. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annual Reviews of Cell Biology*, 10, 405-455.
- Stevens, R. L., Adachi, R. 2007. Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunological Reviews*, 217, 155-167.

- Strait, R. T., Morris, S. C., Yang, M., Qu, X., Finkelman, F. D. 2002. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 4, 658-668.
- Strait, R. T., Morris, S. C., Finkelman, F. D. 2006. IgG blocking antibodies inhibit IgE - mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc γ RIIb cross-link. *The Journal of Clinical Investigation*, 3, 833-841.
- Wong, M., Jeng, A. Y. 1994. Posttranslational modification of glycine-extended substance P by an alpha-amidating enzyme in cultured sensory neurons of dorsal root ganglia. *Journal of Neuroscience Research*, 1, 97-102.
- Yoshikawa, T., Imada, T., Nakakubo, H., Nakamura, N., Naito, K. 2001. Rat mast cell protease-I enhances immunoglobulin E production by mouse B cells stimulated with interleukin-4. *Immunology*, 3, 333-340.

Figure Legends

Figure 1. The relative release of β -hexosaminidase activity of mast cells exposed to mastoparans SynS MP II and I at two different concentrations. Calcium ionophore, compound 48/80 and substance P were used as positive controls. Cells not exposed to any stimulus were used as negative controls. Values are the mean of two independent experiments \pm SD. Tukey's test were performed and differences were statistically significant when * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$.

Figure 2. The relative content of cells expressing green fluorescence protein as a result of induction by mastoparans isolated from *S. surinama* venom at two different concentrations is shown. **(A)** Mastoparans induced NF κ B activation in NF κ B2 cells. Cells stimulated with DNP₄₈-HSA and calcium ionophore served as positive controls and cells incubated only in medium were used as negative controls. **(B)** Mastoparans did not induce NFAT activation in VB9 cells. Incubation with calcium ionophore was used as a positive control. Cells not exposed to stimulus were used as a negative control. Values are the mean of three independent experiments \pm SD. Tukey's test were performed and differences were statistically significant when $p < 0.01$.

Figure 1

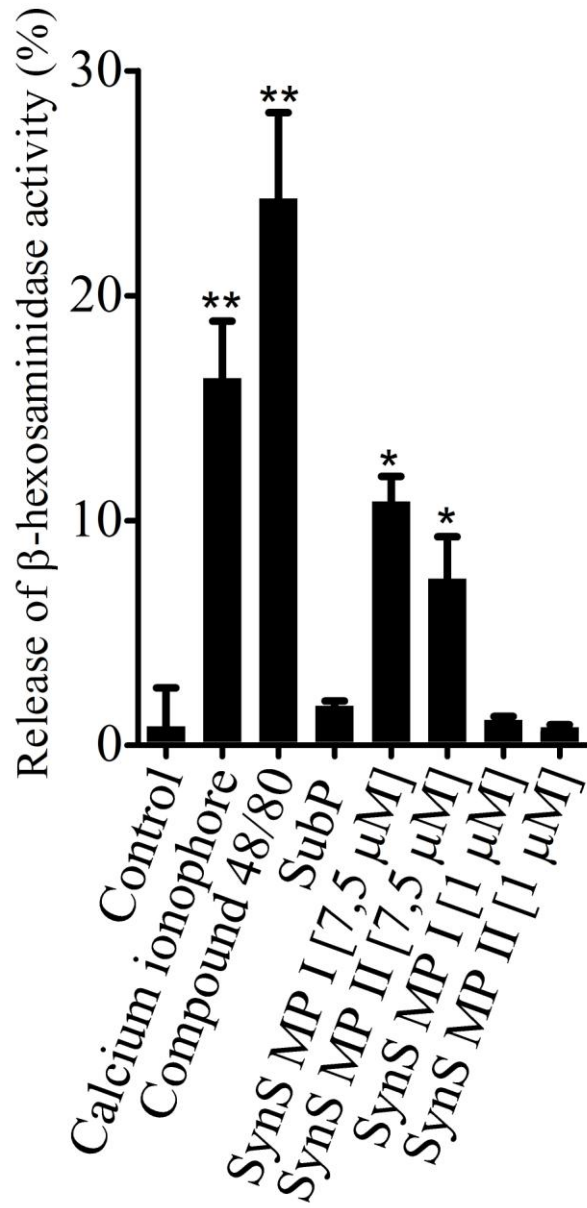
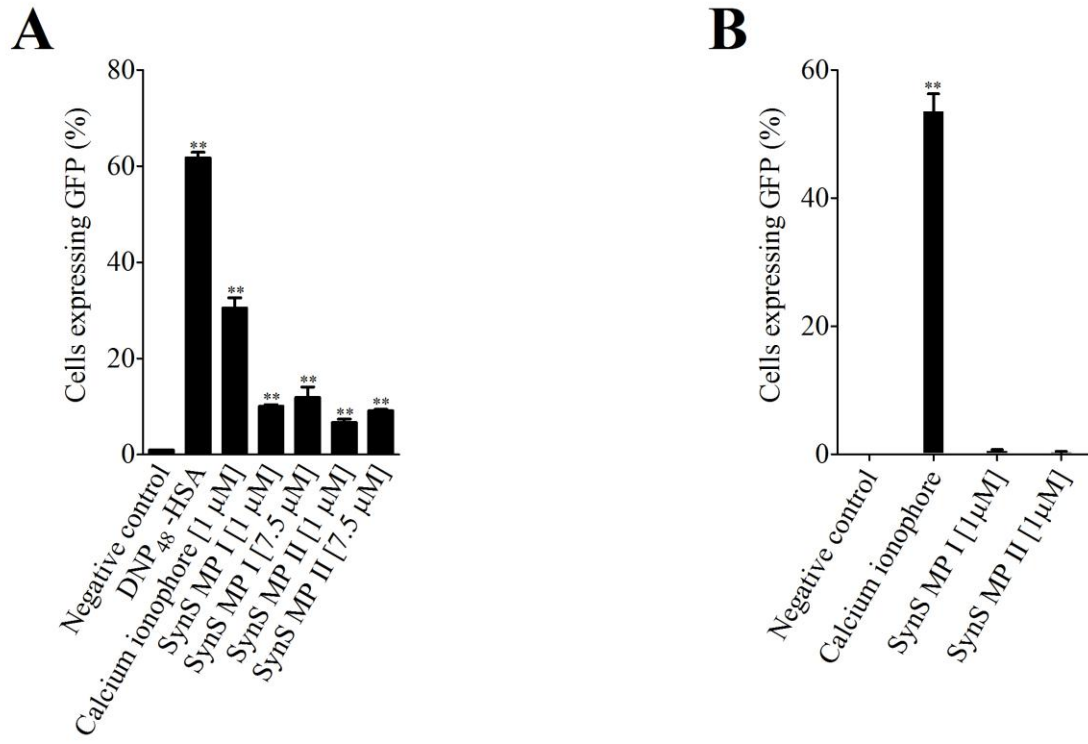
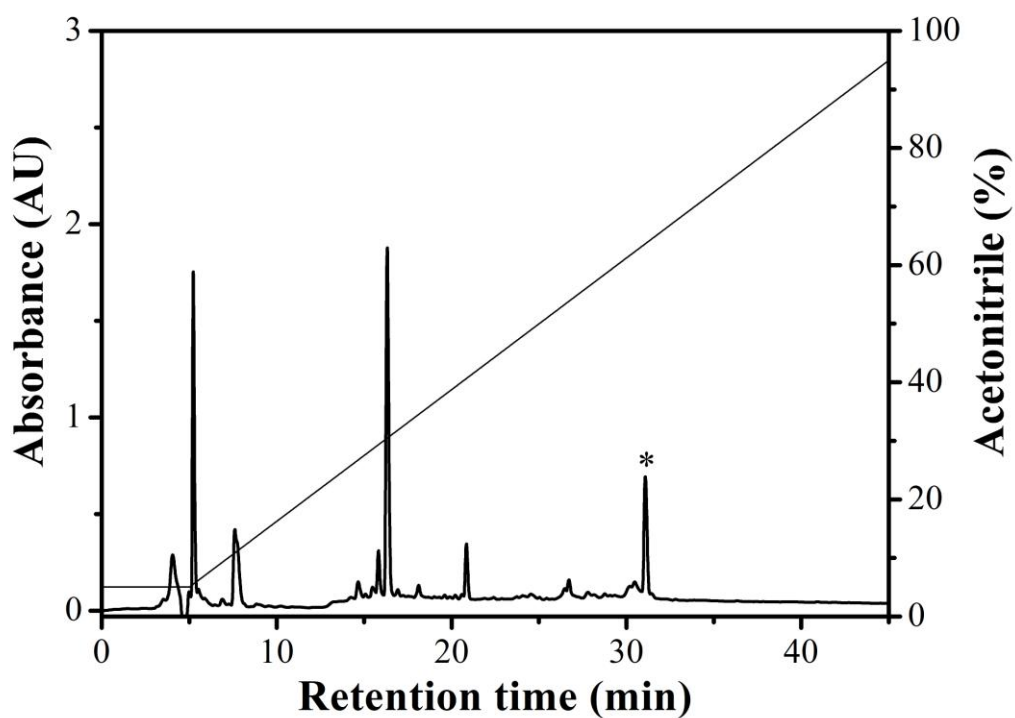


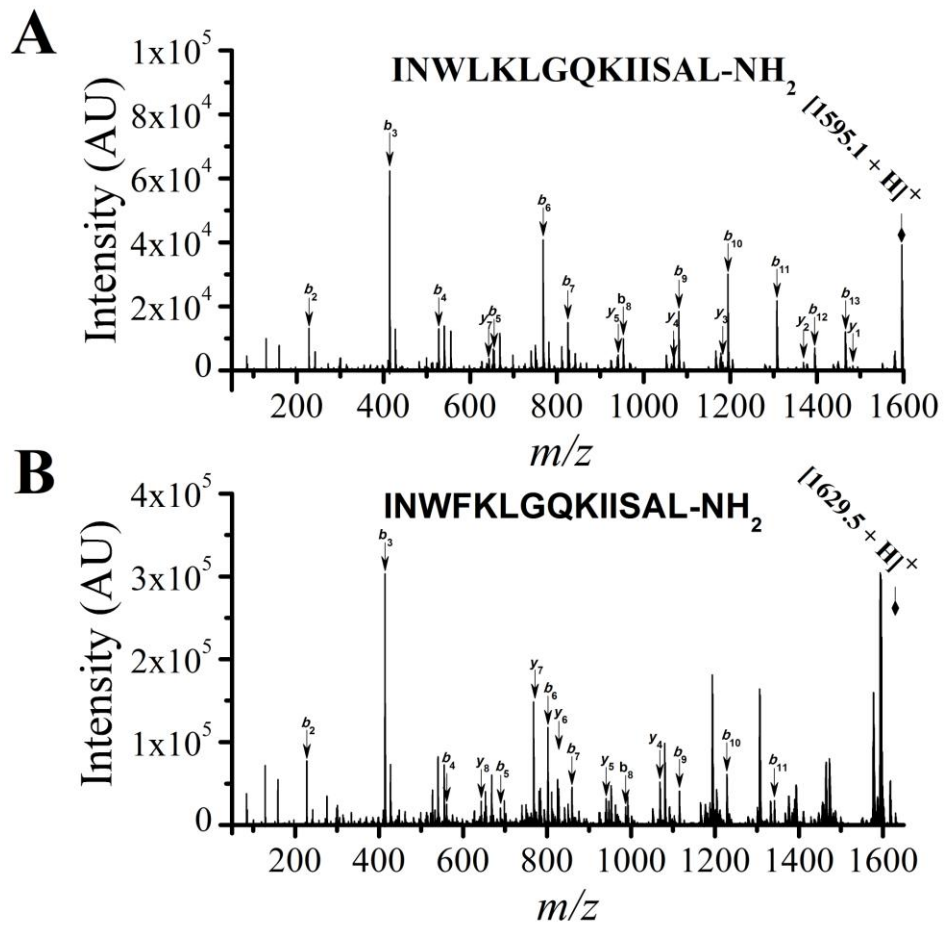
Figure 2



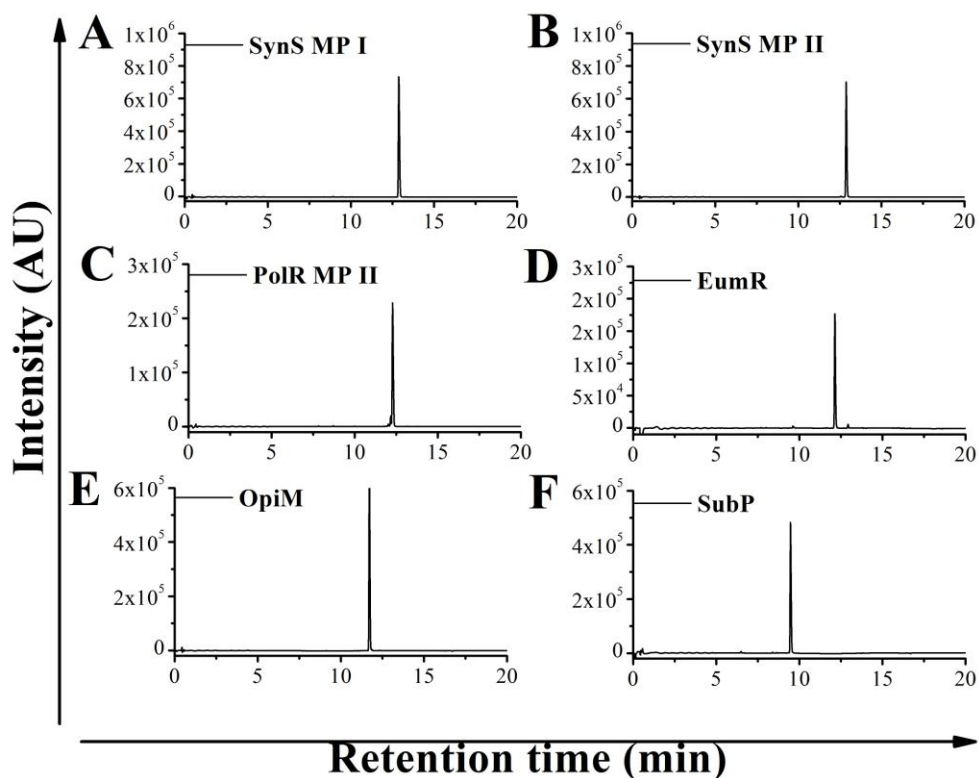
Supplementary Figures



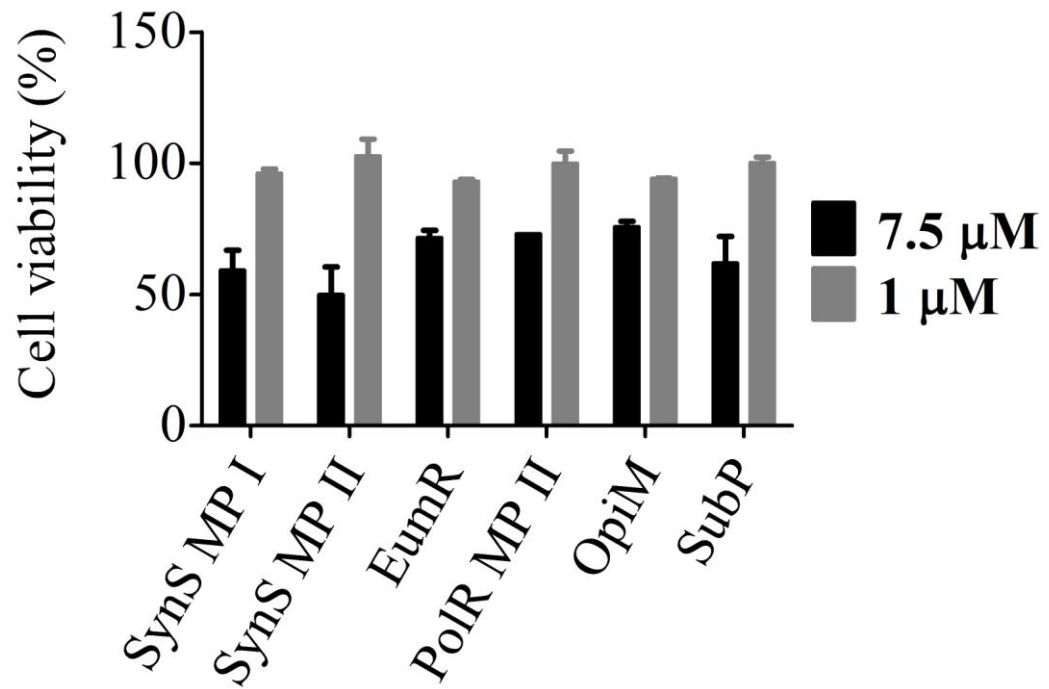
Supplementary Figure S1. Chromatograms of analytical reverse phase analysis of *Synoeca surinama* crude venom. Compounds were eluted by applying linear gradient of acetonitrile ranging from 5% to 95% for 40 min at a flow rate of 1 mL/min and monitored at 216 nm and 280 nm. Peptides SynS MP I and SynS MP II were co-eluted at 31 min.



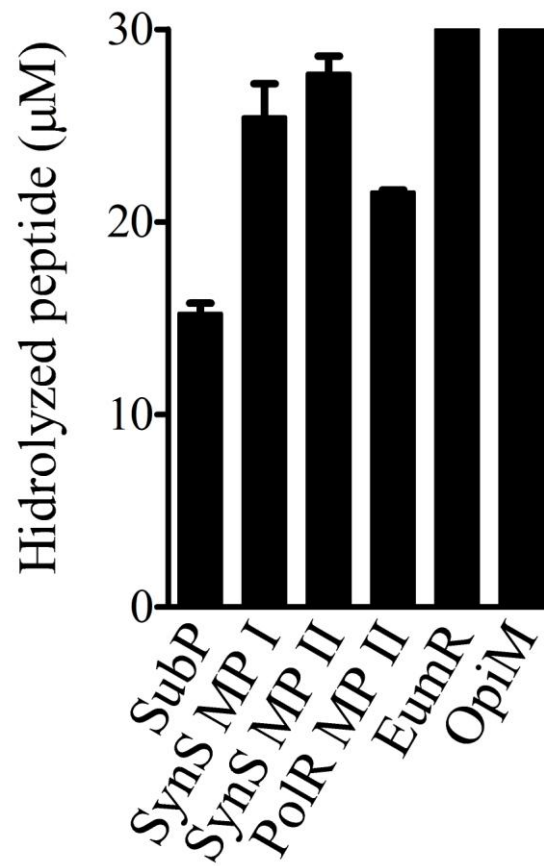
Supplementary Figure S2. MS/MS spectra of the tetradecapeptides isolated from *S. surinama* venom. *De novo* sequencing of peptide called SynS MP I (experimental mass: 1595.1 Da) (**A**) and SynS MP II (experimental mass: 1629.5 Da) (**B**) performed by manual interpretation of MS/MS spectra.



Supplementary Figure S3. Chromatograms of analytical reverse phase analysis of synthetic peptides (SynS MP I (A), SynS MP II (B), PolR MP II (C), EumR (D), OpiM (E) and Sub P (F)) after purification. Peptides were eluted by applying a linear gradient of acetonitrile ranging from 5% to 95% for 20 min at a flow rate of 0.4 mL/min and monitored at 216 nm and 280 nm. The level of homogeneity of purified peptides (more than 95%) was calculated by integration of areas under peaks using Origin (OriginLab, Wellesley Hills, MA).



Supplementary Figure S4. RBL-2H3 mast cell viability after incubation with peptides at two different concentrations.



Supplementary Figure S5. Hydrolysis of peptides after incubation with released mast cell mediators after stimulation by calcium ionophore.