

EFEITO DA CARBOXIAMIDAÇÃO NA ATIVIDADE DO PEPTÍDEO PROTONECTINA (1-6) ISOLADO DE VENENOS DE VESPAS SOCIAIS NEOTROPICAIS.

Virgínia Maria Ferreira Resende, Mário Sergio Palma, Nicoli Barão Baptista Saidemberg, Bibiana Monson de Souza. Subárea – Bioquímica - Ciências Biológicas – Departamento de Biologia/CEIS, Instituto de Biociências – Unesp-Campus de Rio Claro.

Os peptídeos inflamatórios presentes nos venenos de vespas sociais neotropicais podem apresentar diferentes tipos de modificações pós-transcricionais, que geralmente alteram suas atividades biológicas. Assim por exemplo, a carboxiamidação do resíduo C-terminal destes peptídeos pode causar um aumento de atividade, e sua remoção pode resultar na diminuição da mesma. Um novo peptídeo foi encontrado nos venenos de duas espécies de vespas sociais neotropicais, a *Parachartergus pseudoapicalis* e a *Agelaia pallipes pallipes*. Sua sequência indica que ele corresponde aos resíduos de 1 a 6 de um peptídeo maior, já descrito nos venenos de vespas sociais, a Protonectina; por esta razão o peptídeo menor foi designado por Protonectina (1-6). Contudo, em *P. pseudoapicalis* este peptídeo apresenta-se com o resíduo C-terminal carboxilado (ácido), enquanto que em *A. p. pallipes* ele apresenta-se na forma carboxiamidada (básico).

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da carboxiamidação deste resíduo na atividade do peptídeo Protonectina (1-6). O veneno bruto de ambas as vespas foi submetido a fracionamento em HPLC sob fase reversa. As frações obtidas foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo ESI, no modo positivo, e o componente peptídico pode ser identificado através de sequenciamento por Química Degradativa de Edman. Uma vez isolado o peptídeo Protonectina (1-6), revelou as sequências: I-L-G-T-I-I-CO-OH (em *P. pseudoapicalis*) e I-L-G-T-I-I-CO-NH₂ (em *A. p. pallipes*). Foram realizados ensaios de degranulação de mastócitos, hemólise e quimiotaxia para ambas as formas do peptídeo. Para a degranulação de mastócitos, foram usadas células coletadas da cavidade peritonial de ratos Wistar, as quais foram incubadas com os peptídeos; a atividade foi verificada através da medida de liberação de glicoseaminidase. A atividade hemolítica foi determinada utilizando-se eritrócitos de ratos Wistar, os quais também foram incubados com os peptídeos. A quimiotaxia foi realizada com leucócitos polimorfonucleares extraídos de uma inflamação local subcutânea induzida em ratos Wistar; os ensaios foram realizados em câmaras de Quimiotaxia, sendo as leituras realizadas a partir da contagem de células em câmara de Neubauer.

Os perfis cromatográficos obtidos do fracionamento do veneno bruto de *A.p.pallipes* (Figura 1) e *P. pseudoapicalis* (Figura 2) estão mostrados abaixo. Na sequência estão apresentados os espectros de massas das frações com os componentes peptídicos encontrados na fração 2 do veneno de *A. p. pallipes* (Figura 3) e na fração 12 do veneno de *P. pseudoapicalis* (Figura 4).

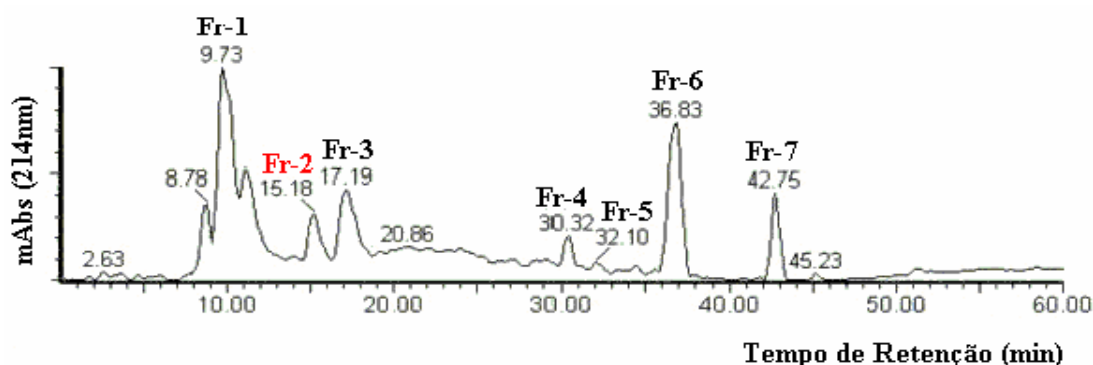


Figura 1: Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* em HPLC de fase reversa, com coluna Nucleosil C-18 (250 x 10mm), sob gradiente linear de 5 a 60% (v/v) de MeCN (contendo TFA 0,1% (v/v)), em fluxo de 2.0ml/min, durante 60 min, monitorando-se a eluição no comprimento de onda de 214nm.

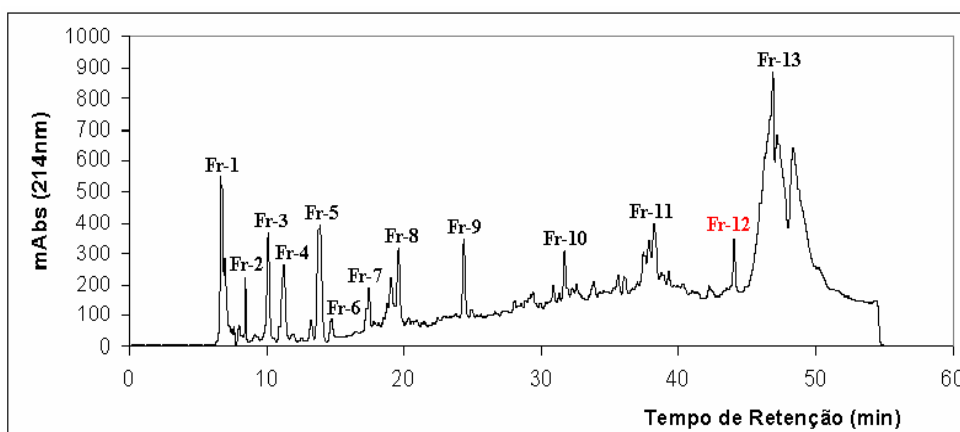


Figura 2: Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social *Parachartergus pseudoapicalis* em HPLC sob fase reversa, utilizando coluna Nucleosil C-18 (250 x 10mm), sob gradiente linear de 5 a 60% (v/v) de MeCN (contendo TFA 0,1% (v/v)), em fluxo de 2.0ml/min, durante 60 min, monitorando-se a eluição no comprimento de onda de 214nm.

A figura 3 mostra um espectro que indica que o componente peptídico presente na fração 2 do veneno de *A. p. pallipes* apresenta massa molecular de 629 Da na forma monoprotonada, enquanto que a figura 4 indica que o componente peptídico presente na fração 12 do veneno de *P. pseudoapicalis* apresenta massa molecular de 630 Da, na forma monoprotonada, além também de formar dímero de massa molecular 1260 Da, na forma $[M + 2H]^{2+}$.

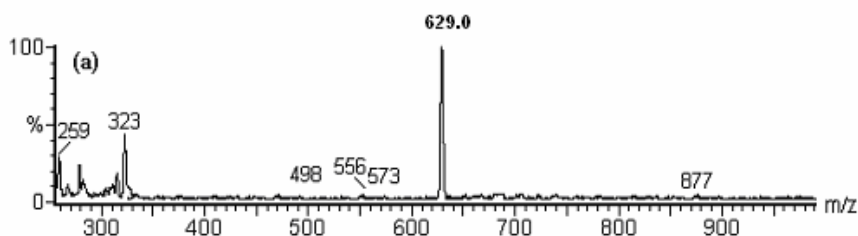


Figura 3: Espectros de massa do tipo ESI, no modo positivo, do componente peptídico presente na fração Fr-2 (a) isolada do veneno bruto da vespa social *A. p. pallipes*.

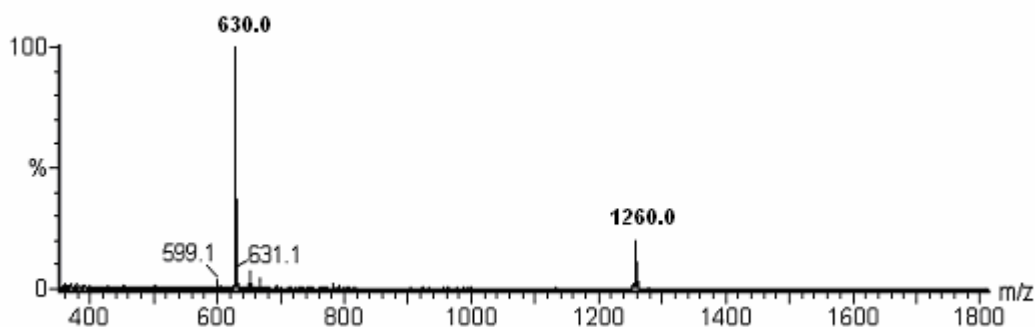


Figura 4: Espectros de massa do tipo ESI, no modo positivo, do componente peptídico presente na fração Fr-12 isolada do veneno bruto da vespa social *P. pseudoapicalis*.

Uma vez isolados, submetidos ao sequenciamento automático por Química Degradativa de Edman e analisados por espectrometria de massas, foram resolvidas as seguintes seqüências:

I-L-G-T-I-I-C-OH (em *P. pseudoapicalis*) e I-L-G-T-I-I-C-NH₂ (em *A. p. pallipes*).

As seqüências acima são compatíveis com as massas observadas nas figuras 3 e 4.

O peptídeo Protonectina (1-6) na forma carboxilada não apresentou nenhuma das atividades testadas. Entretanto, o peptídeo carboxiamidado foi potencialmente quimiotático (Figura 5).

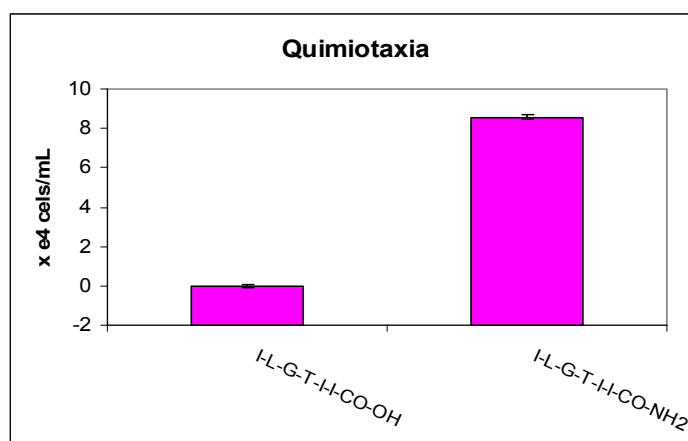


Figura 5: Atividade quimiotática do peptídeo carboxilado e carboxiamidado.

Tais resultados confirmam o modelo já proposto de que o resíduo C-terminal da seqüência tem papel determinante na atividade biológica de toxinas peptídicas e de ação inflamatória nos venenos de vespas sociais.

Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq/PIBIC

Referências Bibliográficas:

SFORÇA, M.L., Jr, OYAHAMA, S., CANDURI, F., LORENZI, C.C.B., PERTINHEZ, T.A., KONNO, K., SOUZA, B.M., PALMA, M.S., NETO, J.R., Jr, AZEVEDO, W.F., SPISNI, A. How C-Terminal Carboxyamidation Alters the Biological Activity of Peptides from Venom of the Eumenine Solitary Wasp. **Biochemistry**, v. 43, p. 5608-5617, 2004.

DOHTSU, K., OKUMURA, K., HAGIWARA, K., PALMA, M.S., NAKAJIMA, T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera-Vespidae). **Natural Toxins**, v.1, p. 271-6, 1993.

MENDES, A. M.; DE SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, n.44, p. 67-74, 2004.

Bolsa: CNPQ/PIBIC

