



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JULIANA FREIRE CHAGAS

**ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES RENAIS E VASCULARES INDUZIDAS
PELO VENENO DA VESPA *Polybia paulista***

FORTALEZA

2009

JULIANA FREIRE CHAGAS

**ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES RENAIS E VASCULARES INDUZIDAS
PELO VENENO DA VESPA *Polybia paulista***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia
Orientadora: Prof^a Dr^a. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2009

C424e Chagas, Juliana Freire

Estudos das alterações renais e vasculares induzidas pelo veneno da vespa *Polybia paulista*/ Juliana Freire Chagas. - Fortaleza, 2009.

95 f.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alice Maria Costa Martins

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

1. Venenos de Vespa 2. Rim 3. Vasos Sanguíneos I. Martins, Alice Maria Costa (orient.) II. Título.

CDD: 615.942

JULIANA FREIRE CHAGAS

**ESTUDOS DAS ALTERAÇÕES RENAIS E VASCULARES INDUZIDAS
PELO VENENO DA VESPA *Polybia paulista***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof^ª. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Dedico

- Aos meus pais, *Luiz e Ester*, alicerces de minha vida.
- Aos meus irmãos, pelo companheirismo e constante apoio.
- Aos meus avós *José e Lúcia, Jaime e Alaíde (in memória)*, meus amores.
- Ao meu noivo, *Ciro Vinhote*, força e confiança sempre presente.

Minhas homenagens especiais:

- À minha orientadora, Dra. *Alice Maria C. Martins*, pela orientação segura, conhecimentos profundos e a quem sou grata por ensinamentos que levarei por toda a vida.
- Ao professor e amigo *Raimundo Oliveira de Souza*, pela paciência, estímulo e atenção, sempre oferecidos.
- Ao doutorando *Daniel Freire*, que muito contribuiu para a realização deste projeto com seus conhecimentos e amizade.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, meu mentor intelectual, que está comigo em todos os momentos.
- ✓ Aos meus familiares, pelo amor, carinho, dedicação e apoio sempre presente.
- ✓ Ao Dr. *Marcus Hikari Toyama*, por todas as contribuições e por ter cedido o veneno de *Polybia paulista*.
- ✓ Ao professor *Dalgimar B. Menezes* pela análise histológica e atenção com que me tratou durante toda a pós-graduação.
- ✓ Ao doutorando Antonio Rafael Jorge pelo prestimoso apoio no transcorrer dos experimentos.
- ✓ Aos colegas do curso de pós-graduação do Laboratório de Farmacologia Renal, *Rafael Ximenes*, *Ticiano Praciano*, *Terentia Batista*, *Claudênio Diógenes* e *Paulo César*.
- ✓ A todos os professores e funcionários de Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, que com suas experiências enriqueceram meus conhecimentos.
- ✓ Aos funcionários do IBIMED *Sílvia Helena*, *Francisca*, *Juciê* e *Bento*, por todo o carinho e respeito com que sempre me trataram.
- ✓ Aos bolsistas do Programa Bolsa de Iniciação Científica da Universidade Federal do Ceará (PIBIC) *Caio Abner*, *João Paulo*, *João Victor* e *Ana Luiza*, pela ajuda nos experimentos de perfusão renal.
- ✓ À Fundação Cearense de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro que me proporcionou condições ideais para a dedicação exclusiva ao curso de Mestrado.
- ✓ A secretária do Programa de Pós-graduação em Farmacologia *Aura Hanes*, pelas vezes que me *socorreu* sempre com muito carinho
- ✓ A cada um que me acompanhou de perto (ou mesmo de longe), deixando uma marca neste trabalho, com todo meu carinho, obrigada!

RESUMO

Peçonhas de *Hymenoptera*, particularmente das famílias *Apidae* (abelhas) e *Vespidae* (vespas), são uma rica fonte de peptídeos e proteínas com atividades biológicas. A espécie *Polybia Paulista* é uma vespa social neotropical muito agressiva e endêmica no Sudeste do Brasil. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos renais e vasculares induzidos pelo veneno da *Polybia paulista* (VPp). Foram utilizados ratos (n = 4) machos Wistar pesando entre 250 e 300g, cujos rins foram isolados e perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit modificada contendo 6g% de albumina bovina previamente dialisada. A menor concentração (1µg/mL) não apresentou efeito nos parâmetros avaliados. Porém, a concentração de 3µg/mL produziu um aumento na pressão de perfusão renal (PP), na resistência vascular renal (RVR), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG). Foi também observada uma redução aos 60' no percentual de transporte tubular de sódio (% TNa⁺). Na avaliação histológica do rim perfundido com VPp foi observado depósito de proteínas nos túbulos renais e nos espaços urinários, bem como regiões focais de necrose/apoptose. A citotoxicidade do veneno da *Polybia paulista* em cultura de células MDCK foi analisada através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT). O veneno promoveu um efeito citotóxico dependente de concentração com um valor de IC₅₀ de 25.81µg/mL. Também foram mensurados os níveis de lactato desidrogenase (LDH) e observado um aumento significativo nas maiores concentrações estudadas. No estudo em leito mesentérico a pressão de perfusão foi mensurada através de um transdutor de pressão. O efeito vascular do VPp (3µg/mL) não alterou a pressão basal, na concentração de 10µg/mL, foi observado um aumento pressórico discreto e na concentração de 100 µg/mL, foi observado um acentuado aumento na pressão de perfusão basal. O efeito vasoconstritor observado no estudo renal e em leito mesentérico, também foi demonstrado no protocolo de anel de aorta, sendo observado de maneira concentração dependente, um aumento do tônus basal após a infusão do VPp. Em conclusão, o VPp causou nefrotoxicidade, sugestivo de uma ação direta com morte celular em células do túbulo renal por necrose. O efeito vascular contrátil que envolve influxo de cálcio através de canais operados por voltagem, provavelmente é mediado pela ativação de receptores alfa adrenérgicos.

Palavras-chave: Venenos de Vespas. Rim. Vasos Sanguíneos.

ABSTRACT

Hymenoptera poisons are particularly found in the *Apidae* (bees) and *Vespidae* (wasps) families, they have some rich peptides and proteins with important biological activities. The species of *Polybia paulista* is a very aggressive social wasp and is a neotropical endemic in the Southeast of Brazil. The objective of this present work was to study the renal effects and the vascular reactivity induced by the poison of *Polybia paulista* (VPp). Isolated kidneys from Wistar rats weighing between 250 to 300g were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6g% of previously dialysed bovine serum albumin. The lowest venom concentration (1µg/mL) did not showed any effect. However, the highest concentration (3µg/mL) produced an increased in the perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF) and glomerular filtration rate (GFR). It was also observed a reduction at 60' in the percentile of tubular transport of sodium (% TNa⁺). The histological evaluation of the kidney with VPp demonstrated deposit of proteins in the renal tubules and in the urinary spaces, as well as, focal areas of necrosis/apoptosis. The analysis of cytotoxic effects of the *Polybia paulista* venom on MDCK cells was performed by the rehearsal colorimeter with tetrazolium salt (MTT) method. The venom promoted a concentration-dependent cytotoxic effect with an IC₅₀ value of 25.81µg/mL. Also the levels of lactic dehydrogenase (LDH) were measured and a significant increase was observed in the largest studies concentrations. The study in mesenteric bed showed a variable perfusion pressure that was measured by means of a pressure transducer. The vascular effects of *Polybia paulista* venom (3µg/mL) did not alter the basal perfusion pressure in isolated arteriolar mesenteric bed. The venom concentration of 10µg/mL demonstrated an accentuated increase in the pressure, and at the highest concentration (100 µg/mL) it was found a great increase in the basal perfusion pressure in isolated arteriolar mesenteric bed. The vasoconstriction effects observed in the renal study and in mesenteric bed were also demonstrated in the aortic ring assay in which, has being observed an induced concentration-dependent contraction in the basal tonus after the infusion of VPp. In conclusion, VPp caused nephrotoxicity, suggestive of a direct action within cellular death by necrosis in the renal tubule cells. The contractile vascular effect that involves calcium influx through a voltage operated channels, is probably mediated by the activation of alpha adrenergic receptors.

Keywords: Wasp Venoms. Kidney. Blood Vessels.

LISTA DE FIGURAS

1. Fluxograma para identificação das famílias e subfamílias da ordem <i>Hymenoptera</i>	20
2. Fluxograma para identificação das tribos e seus gêneros pertencentes à subfamília <i>Polistinae</i>	21
3. Foto de vespas demonstrando a ligação entre tórax e abdômen com uma cintura fina, patas sem pelos.....	23
4. Vespa solitária (<i>Eumeninae</i>) transportando lagarta de borboleta recém-capturada (A), e ninho de barro, construído também por vespa solitária (B).	24
5. Colônia da vespa social <i>Polybia paulista</i> em construção urbana (A) e colônia da vespa social <i>Polybia platycephala</i> em plantas de jardim (B). Ninhos formados por favos feitos de um tipo de pasta com consistência de papel	25
6. Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado	37
7. Foto do sistema de perfusão de rim isolado.....	37
8. Administração de manitol pela veia femoral no animal anestesiado	39
9. Canulação do ureter.....	39
10. Visualização da artéria renal	40
11. Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.	40
12. Fotografia do rim isolado no sistema de perfusão.....	41
13. Esquema simplificado do cultivo e tratamento das células MDCK.....	45
14. Esquema simplificado dos ensaios de viabilidade e proliferação celular	46
15. Isolamento da artéria mesentérica.	48
16. Canulação da artéria mesentérica.....	48
17. Leito vascular mesentérico ainda ligado ao intestino do animal.....	49
18. Leito vascular mesentérico isolado e acoplado ao sistema.....	49
19. Representação gráfica do sistema de perfusão	50
20. Foto do sistema de perfusão do leito mesentérico	50
21. Visualização do segmento torácico da aorta.	52
22. Segmento da aorta torácica isolada e devidamente dissecado.	52

23. Anel da aorta acoplado em peças metálicas triangulares	53
24. Anel da aorta na cuba com solução de Tyrode devidamente aerada.	53
25. Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolada de rato.....	54
26. Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados	54
27. Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controles e tratados com veneno da vespa <i>Polybia paulista</i> (VPp).....	58
28. Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controles e tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPp)	59
29. Fluxo Urinário (FU) nos grupos controles e tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPp).....	60
30. Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controles e tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPp).....	61
31. Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controles e tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPp)	62
32. A. Fotomicrografia de rim esquerdo demonstrando túbulos e glomérulos normais. B. Corte histológico de rim direito perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit modificada.....	64
33. Fotomicrografia de rim perfundido com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPp) na concentração de 3µg/mL. A: Glomérulos; B: túbulos renais.....	65
34. Fotomicrografia de rins perfundidos com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPp) na concentração de 3 µg/mL, A: Núcleos Picnóticos; B: células anucleadas.....	66
35. Efeito do veneno da <i>Polybia paulista</i> em células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)	67
36. Fotomicrografia das células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição do veneno da <i>Polybia paulista</i> . A: controle; B: 25 µg/mL	68
37. Fotomicrografia das células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição do veneno da <i>Polybia paulista</i> . A: controle; B: 50 µg/mL	69
38. Fotomicrografia das células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição do veneno da <i>Polybia paulista</i> . A: controle; B: 100 µg/mL	70
39. Liberação de Lactato desidrogenase (LDH) após a adição de diferentes concentrações do veneno da <i>Polybia paulista</i> em células MDCK.....	71

40. Pressão de perfusão de leito mesentérico em ratos tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (3µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL).....	73
41. Pressão de perfusão de leito mesentérico em ratos tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (10µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL).....	74
42. Pressão de perfusão de leito mesentérico em ratos tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (100µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL).....	75
43. Comparação entre as doses utilizadas do veneno de <i>Polybia paulista</i> (3,10 e 100µg/mL; n=4).....	76
44. Curva concentração – efeito do veneno da <i>Polybia paulista</i> em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca ²⁺	77
45. Curva concentração - efeito do veneno da <i>Polybia paulista</i> em aorta com o endotélio intacto na presença de fentolamina	78
46. Curva concentração – efeito do veneno de <i>Polybia paulista</i> em aorta com o endotélio intacto na presença do verapamil	79

LISTA DE QUADROS

1. Demonstração dos gêneros da tribo *Epiponini* e sua ocorrência no Brasil.... 22
2. Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renal. 43

LISTA DE TABELAS

1. Pressão de perfusão (mmHg) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno da <i>Polybia paulista</i>	58
2. Resistência Vascular Renal (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno da <i>Polybia paulista</i>	59
3. Fluxo Urinário (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno da <i>Polybia paulista</i>	60
4. Ritmo de Filtração Glomerular (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) nos grupos controle (n= 4) e tratados (n = 4) com veneno da <i>Polybia paulista</i>	61
5. Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPP) nas concentrações de 1µg/mL e 3µg/mL	62
6. Percentual de Transporte Tubular de potássio (%TK ⁺) e cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno de <i>Polybia paulista</i> (VPP) nas concentrações de 1µg/mL e 3µg/mL	63
7. Pressão de perfusão do leito mesentérico em ratos tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (3µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL)	73
8. Pressão de perfusão do leito mesentérico em ratos tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (10µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL)	74
9. Pressão de perfusão do leito mesentérico em ratos tratados com veneno de <i>Polybia paulista</i> (100µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL)	75
10. Comparação entre as doses utilizadas do veneno de <i>Polybia paulista</i> (3,10 e 100µg/mL; n=4)	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
Ca⁺⁺	Íon cálcio
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
Cl⁻	Íon cloreto
ECI⁻	Excreção do íon cloreto
EK⁺	Excreção do íon potássio
ENa⁺	Excreção do íon sódio
FU	Fluxo Urinário
K⁺	Íon potássio
LFAVET	Laboratório de Farmacologia em Venenos e Toxinas
LDH	Enzima Lactato Desidrogenase
Na⁺	Íon sódio
p	Significância estatística
PP	Pressão de Perfusão
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
RVR	Resistência Vascular renal
UFC	Universidade Federal do Ceará
VPp	Veneno da <i>Polybia paulista</i>
%TCI⁻	Percentual de transporte tubular de cloreto
%TK⁺	Percentual de transporte tubular de potássio
%TNa⁺	Percentual de transporte tubular de sódio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Considerações gerais.....	17
1.2 Família <i>Vespidae</i> (vespas)	19
1.2.1 Taxonomia e distribuição geográfica.....	19
1.2.2 Características da Família <i>Vespidae</i>	23
1.2.3 Composição bioquímica do veneno de vespa	25
1.3 Efeitos do veneno de vespas	28
1.4 Fisiologia Renal e leito Mesentérico.....	29
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Geral	34
3.2 Específicos.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais de experimentação	35
4.2 Veneno, células e substâncias utilizadas	35
4.3 Perfusão de rim isolado.....	35
4.3.1 Sistema utilizado	35
4.3.2 Calibração do sistema.....	38
4.3.3 Solução perfusora	38
4.3.4 Técnica cirúrgica	38
4.3.5 Grupos experimentais	41
4.3.6 Protocolo experimental.....	42
4.3.7 Análise bioquímicas dos perfusatos e urinas	42
4.3.8 Calculo dos parâmetros funcionais renais.....	42
4.3.9 Estudo Histológico.....	44

4.4	Ensaio com cultura de células renais	44
4.4.1	Cultivo e tratamento das células MDCK	44
4.4.2	Ensaio de viabilidade e citotoxicidade celular.....	45
4.4.3	Ensaio para determinação da lactato desidrogenase (LDH)	47
4.5	Leito Mesentérico	47
4.6	Ensaio em Anel de aorta	51
4.6.1	Protocolos experimentais	55
4.7	Análise estatística	56
4.8	Comitê de ética	56
5	RESULTADOS	57
5.1	Perfusão de rim isolado	57
5.2	Análises Histológicas dos rins perfundidos.....	64
5.3	Efeitos do veneno da <i>Polybia paulista</i> em células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)	67
5.4	Liberação de lactato desidrogenase (LDH)	71
5.5	Leito vascular mesentérico.....	72
5.5	Efeito do veneno em anel de aorta isolada de rato	77
6	DISCUSSÃO	80
7	CONCLUSÕES	86
9	REFERÊNCIAS	87
ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

O Brasil é um país com características climáticas e geográficas muito variadas, possuindo assim, uma ampla diversidade biológica. Desta forma, é considerado como um ambiente rico para diversos estudos com produtos naturais, os quais constituem uma fonte importantíssima de novos compostos para serem utilizados na terapêutica. A pesquisa por novos fármacos cresceu bastante nos últimos anos, principalmente a partir de substâncias bioativas extraídas de plantas e animais (PALMA *et al.*, 2009).

Toxinologia, uma ciência em contínua expansão no Brasil e no mundo, corresponde ao estudo de toxinas derivadas de microrganismos, plantas, animais e suas conseqüências no organismo humano. Estão inseridos nesse contexto as plantas tóxicas, as bactérias, os fungos produtores de toxinas, as serpentes, escorpiões, abelhas, vespas, animais marinhos e aranhas. (BARRAVIERA, 1994; MEBS, 2002). As toxinas estão, normalmente, envolvidas em mecanismos de defesa contra inimigos. O estudo com toxinas contribui para a descoberta de ferramentas farmacológicas, assim como para a compreensão do seu mecanismo de ação proporcionando a melhoria nos protocolos de tratamento de pacientes envolvidos em acidentes com esses seres vivos (LEWIS; GARCIA, 2003).

Pesquisas com toxinas de origem animal têm contribuído muito na compreensão de problemas vasculares, neurológicos, processos inflamatórios, analgesias, processos alérgicos, asma entre outros. Venenos de invertebrados têm interesse como potencial fonte de substâncias bioativas (MORTARI *et al.*, 2007).

Desde o tempo dos Hebreus, Gregos e Egípcios, há relatos da importância econômica dos insetos sociais (WILSON, 2007). No entanto, somente dezenove séculos após o início da Era Cristã (ou Era Comum), os venenos desses animais despertaram interesses de pesquisadores (SPRADBERY, 1973).

Os insetos são os mais numerosos grupos de animais da biosfera podendo ser classificados de acordo com suas relações com o homem, como insetos úteis e nocivos (GARCIA, 1999). Juntamente com os crustáceos e outros artrópodes, compõem cerca de 70% das espécies existentes no planeta, sendo que a Classe *Insecta*, sozinhos, possuem diversidade maior que qualquer outro animal terrestre já descrito até os dias de hoje (LIMA; de LIMA; PREZOTO, 2000).

Os insetos possuem uma diversidade química em seu veneno, que é utilizado na defesa contra predadores. Em geral, os insetos possuem a capacidade de metabolizar compostos orgânicos oriundos de plantas, que são adquiridos durante sua dieta alimentar, e esses compostos tornam-se potencialmente úteis no mecanismo de defesa (LIMA; de LIMA; PREZOTO, 2000).

A classe *Insecta*, pertencente ao filo *Artropoda* (do grego *arthros* ou articulação + *podos* ou pé), é composta por mais de um milhão de espécies e são os mais importantes invertebrados, podendo viver em ambientes secos e úmidos. A ordem *Hymenoptera* é formadora de mais de 200.000 espécies, da qual possui interesse clínico significativo, uma vez que muitos envenenamentos de importância médica são causados por membros pertencentes às famílias *Apidae* (abelhas), *Formicidae* (formigas) e *Vespidae* (vespas) (STEEN *et al.*, 2005).

Os artrópodes destacam-se por sua diversidade e abundância. Os aspectos fisiopatológicos, epidemiológicos e ambientais de grupos de artrópodes como aranhas, insetos e centopéias em regiões tropicais são escassos de estudos na literatura (FREITAS *et al.*, 2006).

Esher *et al.* (2001), demonstraram que 32,6% dos acidentes por ferroadas de *Hymenoptera* são ocasionados por vespas, 28,2% por abelhas e 26,8% por formigas. Na Europa, a prevalência de indivíduos alérgicos a esse tipo de veneno é de aproximadamente 20% e a incidência de casos fatais varia de 0,1 a 0,5 por milhão de habitantes por ano, resultando em cerca de 100 mortes / ano. No Brasil, ocorrem entre 1 e 5 casos fatais por ano (PEDRO, 2005).

Até a década de 80, os dados disponíveis sobre acidentes com animais peçonhentos no Brasil eram obtidos, fundamentalmente, através de relatos. Sendo assim, a incidência desses acidentes é desconhecida, porém a hipersensibilidade provocada por picada de insetos tem sido estimada, na literatura médica, em valores de 0,4% a 10% nas populações estudadas (BRASIL, 2001). Venenos de *Hymenoptera* são responsáveis por 9,3-28,5% dos casos de sensibilização com predominância em países tropicais (ANTONICELLI *et al.*, 2002). Como grande parte dos acidentes ocorridos por vespas acontece na zona rural, os dados epidemiológicos são esparsos e incompletos (BRASIL, 2001; BOCHNER; STRUCHINER, 2002).

A partir de 1988, os acidentes provocados por aranhas, escorpiões, abelhas, vespas e outros animais peçonhentos de interesse médico-sanitário passaram a ser de notificação obrigatória, fazendo parte do Programa de Controle dos Acidentes por Animais Peçonhentos e no ano de 2001 essas notificações passaram a ser voluntário (BOCHNER; STRUCHINER, 2002).

1.2 Família *Vespidae*

1.2.1 Taxonomia e distribuição geográfica

A família *Vespidae* está distribuídas em seis subfamílias, três de hábitos sociais e três de hábitos solitários, como demonstra na figura 1 (RICHARDS, 1978; CARPENTER; MARQUES, 2001).

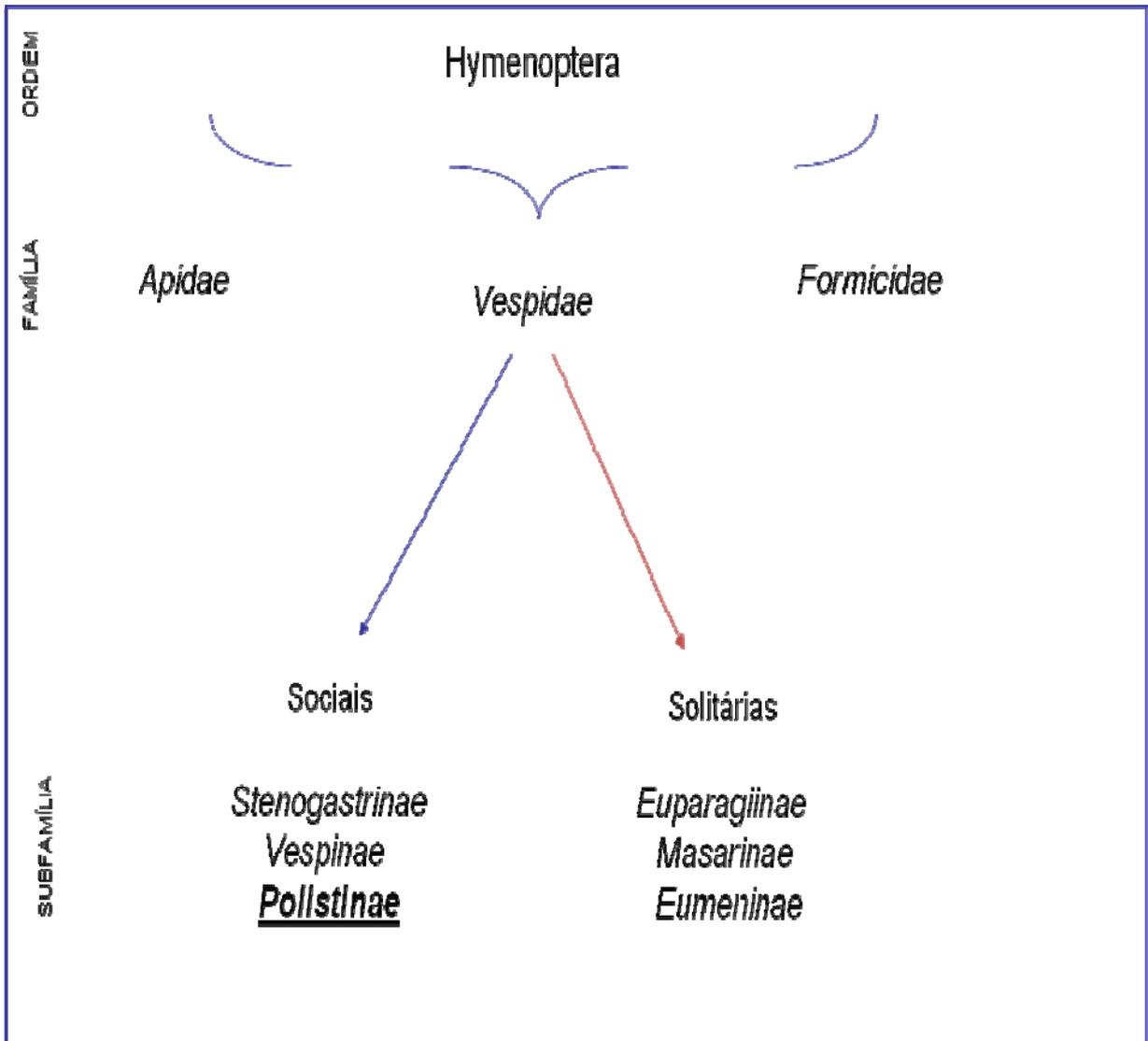


Figura 1 - Fluxograma para identificação das famílias e subfamílias da ordem *Hymenoptera*.

Fonte: UNESP, 2009

A subfamília *Vespinae*, distribuída por toda América do Norte, sudoeste Asiático, Europa, Índia e parte da África, e a subfamília *Polistinae*, distribuída pela Austrália, Índia, África, América do Sul e Central, contêm a maioria dos vespídeos sociais enquanto que a subfamília *Stenogastrinae* possui cerca de 40 a 60 espécies distribuídas pelo sudoeste Asiático (AKRE; REED, 1999 *apud* BUZIN, 1999).

No Brasil, ocorre somente à subfamília *Polistinae*, sendo esta, formada por três tribos, a *Polistini*, formada por um único gênero *Polistes*; a *Mischocyttarini*, também formada por um único gênero *Mischocyttarus*; e a *Epiponini*, que engloba diversos gêneros (figura 2) (UNESP, 2009).

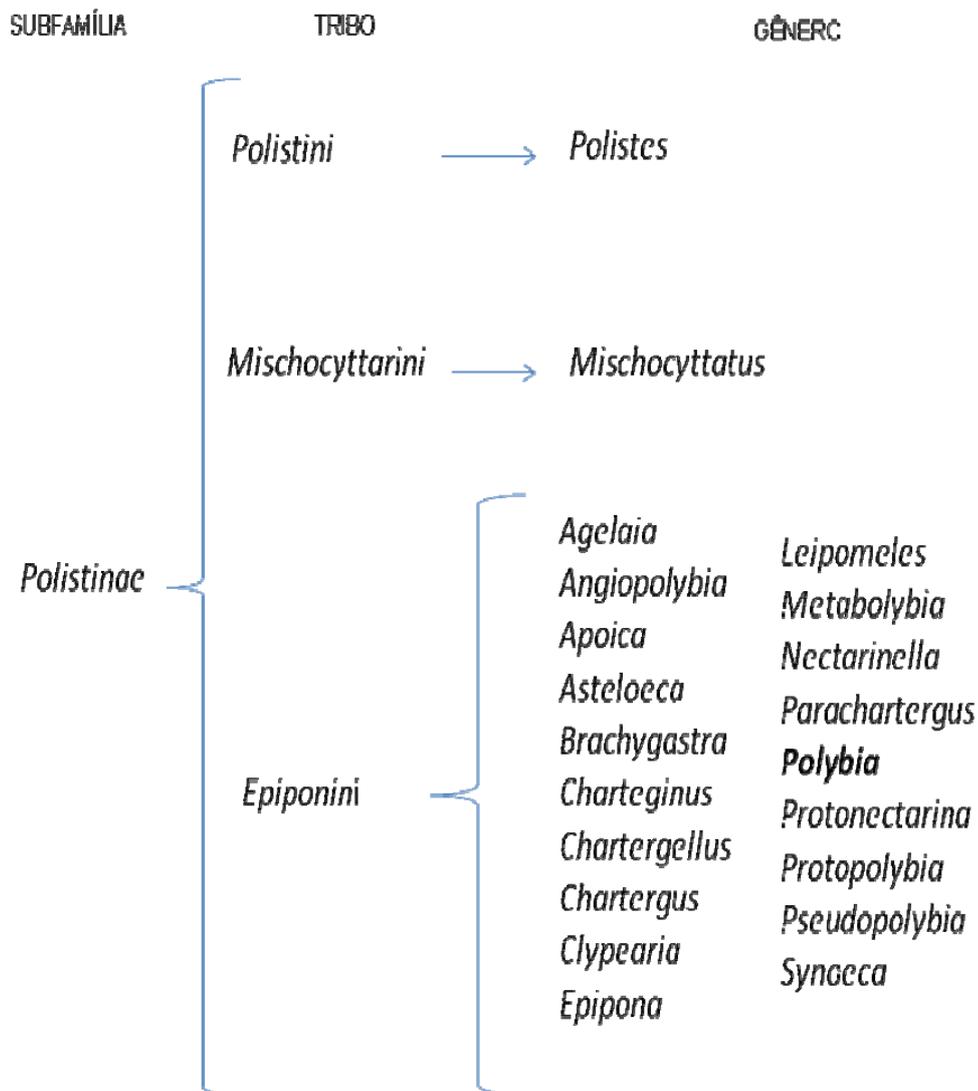


Figura 2 - Fluxograma para identificação das tribos e seus gêneros pertencentes à subfamília *Polistinae*.

Fonte: IBILCE, 2009

No Brasil há representantes de todos os gêneros de *Epiponini*, com 226 espécies descritas e aproximadamente 150 delas ocorrendo na região sudeste do país (quadro 1) (CARPENTER; MARQUES, 2001; IBILCE, 2009).

Quadro 1 - Demonstração dos gêneros da tribo *Epiponini* e sua ocorrência no Brasil.

Gêneros	Quantidades de espécies com ocorrência no Brasil
<i>Agelaia</i>	24 espécies do México até norte Argentina. No Brasil: 15 espécies
<i>Angiopolybia</i>	4 espécies encontradas no Panamá até a Bolívia. No Brasil: 3 espécies descritas
<i>Apoica</i>	8 espécies do México até a Argentina. No Brasil: todas as 8 espécies
<i>Asteloeca</i>	3 espécies descritas encontradas desde a Colômbia até a Bolívia, inclusive no Brasil
<i>Brachygastra</i>	16 espécies distribuem-se do sudoeste do EUA até a Argentina. No Brasil 11 espécies
<i>Charteginus</i>	6 espécies de Honduras até a Bolívia. No Brasil: 2 espécies
<i>Chartergellus</i>	8 espécies distribuídas do sudeste do Brasil até a Costa Rica. No Brasil: 6 espécies
<i>Chartergus</i>	3 espécies presentes do sul do Brasil até o Paraguai. No Brasil: 3 espécies
<i>Clypearia</i>	8 espécies presentes do México até Bolívia. No Brasil: 7 espécies
<i>Epipona</i>	4 espécies distribuídas do México até a Bolívia. No Brasil: 3 espécies
<i>Leipomeles</i>	Apenas 4 espécies abrangendo desde o Brasil até a Costa Rica
<i>Metabolybia</i>	15 espécies desde o México até o Paraguai. No Brasil: 7 encontradas
<i>Nectarinella</i>	Abrange 2 espécies. Uma encontrada na Costa Rica e outra do Brasil
<i>Parachartergus</i>	16 espécies distribuídas do México até a Argentina. No Brasil: 10 espécies
<i>Polybia</i>	Dividido em 11 subgêneros com 57 espécies encontradas dos EUA à Argentina. No Brasil são descritas 44 espécies.
<i>Protonectarina</i>	Apenas 1 espécie distribuída do Brasil até a Argentina
<i>Protopolybia</i>	30 espécies encontradas desde a Guatemala até a Argentina. No Brasil: 15 espécies
<i>Pseudopolybia</i>	4 espécies com distribuição desde a Nicarágua até a Bolívia. No Brasil: 3 espécies
<i>Synoeca</i>	5 espécies encontradas desde o México até a Argentina. No Brasil: 4 espécies

Fonte: IBILCE, 2009

1.2.2 Características da Família *Vespidae*

As vespas possuem uma característica marcante, assim como todas as fêmeas de *Hymenoptera*, que é a presença de ferrão. Nos acidentes com vespas, os ferrões com as glândulas produtoras do veneno não permanecem na pele após a picada (ANDENA, 2007).

Morfologicamente as vespas apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome (figura 3). O abdômen é afilado existindo entre ele e o tórax uma estrutura relativamente alongada, chamada pedicelo e popularmente conhecida como “cintura”, tornando seus corpos mais esbeltos e aerodinâmicos para a caça, diferenciando-as das abelhas (BRASIL, 2001; ANDENA, 2007).

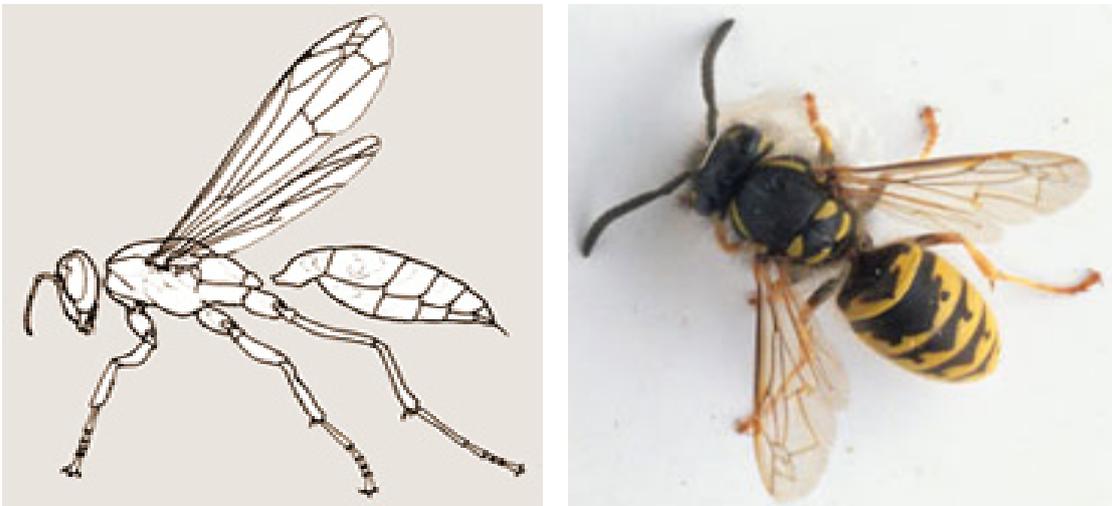


Figura 3 - Foto de vespas demonstrando a ligação entre tórax e abdômen com uma cintura fina, patas sem pelos.

Fonte: <http://www.desinsetlaglos.com.br>

Amplamente distribuídas, exceto nas regiões mais geladas, podem ser classificadas de acordo com a sua organização social, em solitárias e sociais. No Brasil, muitas dessas espécies também são chamadas de maribondos. O grupo das vespas solitárias inclui as parasitóides e/ou predadoras de invertebrados, como lagartas, grilos, percevejos, embora os adultos possam se alimentar de néctar ou pólen. (ANDENA, 2007; PREZOTO, 2008). Algumas espécies carregam as presas para seus ninhos (figura 4).



Figura 4 - Vespa solitária (*Eumeninae*) transportando lagarta de borboleta recém-capturada (A), e ninho de barro, construído também por vespa solitária (B).
Fonte: PREZOTO, 2008

Os ninhos das vespas sociais, formado por um ou mais favos feitos de um tipo de pasta que tem consistência de papel, podem ser construídos embaixo de folhas, em troncos de árvores e em áreas urbanas, seja em construções humanas ou em plantas de praças e jardins (figura 5). As vespas para construir seus ninhos geralmente usam fibras vegetais decompostas. Elas trituram as fibras nas mandíbulas e misturam com saliva, produzindo um material semelhante ao papel, que protege contra umidade e ajuda a manter a temperatura interna (ANDENA, 2007; PREZOTO, 2008).

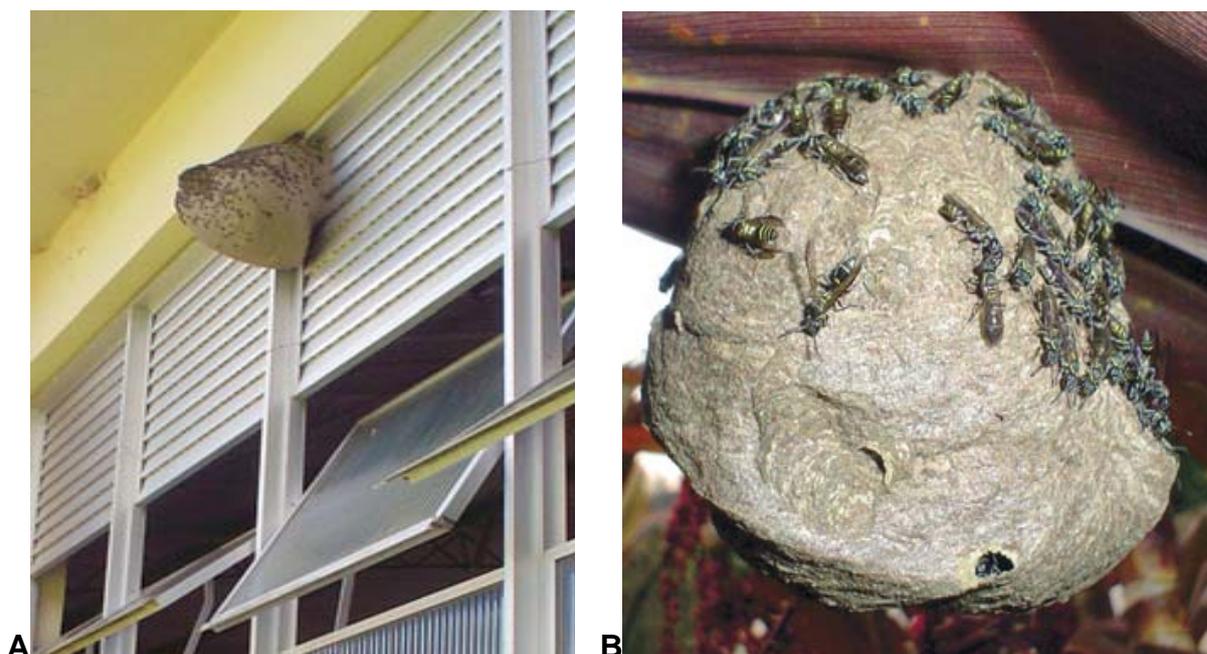


Figura 5 - Colônia da vespa social *Polybia paulista* em construção urbana (A) e colônia da vespa social *Polybia platycephala* em plantas de jardim (B). Ninhos formados por favos feitos de um tipo de pasta com consistência de papel.

Fonte: PREZOTO, 2008

1.2.3 Composição bioquímica do veneno de vespa

Peçonhas de *Hymenoptera*, particularmente das famílias *Apidae* (abelhas) e *Vespidae* (vespas), são constituídas de peptídeos e proteínas com atividade biológica. O veneno também contém substâncias de baixo peso molecular, tais como aminoácidos e catecolaminas (EDERY *et al.*, 1978; PIEK, 1992; GRIESBACKER *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2004).

1.2.3.1 Aminas Biogênicas

As aminas biogênicas são componentes comuns em venenos de vespas. A histamina está presente na peçonha de abelhas, vespas e serpentes e seu mecanismo de ação contribui para reduzir a dor e a vasodilatação local que acompanha a picada (EDERY *et al.*, 1978).

A 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina ocorre em grande variedade de peçonhas de artrópodes, sendo também encontrada em várias espécies de vespas,

promovendo uma maior penetração da toxinas nos tecidos (HABERMANN, 1972; EDERY *et al.*, 1978).

Outras aminas como a dopamina, adrenalina e noradrenalina foram identificadas no veneno de algumas espécies (OWEN; BRIDGES, 1982). A concentração de dopamina em peçonhas de vespas é maior quando comparada com a de outras catecolaminas. Por outro lado, os níveis de dopamina, noradrenalina e adrenalina variam consideravelmente dentre as diferentes espécies. A dopamina aumenta a circulação da hemolinfa e, assim, facilita uma rápida distribuição de outros componentes tóxicos da peçonha (HABERMANN, 1972; GRISOTTO *et al.*, 2006). Em humanos, as catecolaminas contribuem para vasoconstrição (EDERY *et al.*, 1978).

1.2.3.2 Peptídeos

Os peptídeos, tais como mastoparanos, cininas, neurotoxinas e peptídeos quimiotáticos têm sido isolados e caracterizados da peçonha de vespídeos e representam o principal grupo de componentes do veneno. Vários deles têm papel importante na inflamação, dor, edema, eritema, reações alérgicas locais e sistêmicas que frequentemente ocorrem após a picada (LORENZI, 2002). Esses peptídeos são representados, principalmente, pelos mastoparanos (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Os mastoparanos (MP), presentes na maioria das espécies de *vespidae* apresentam atividade liberadora de histamina a partir da degranulação de mastócitos (HABERMANN, 1972; HIRAI *et al.*, 1979; DE SOUZA, *et al.*, 2004). Isolados das peçonhas de algumas espécies de vespa, causam profunda queda na pressão sangüínea e disfunção cardíaca após injeção intravenosa em ratos, o que sugere um possível envolvimento desse peptídeo nos distúrbios cardiovasculares observados com a peçonha (LIU *et al.*, 2007).

Outras alterações biológicas produzidas pelos MP incluem a atividade antimicrobiana (MENDES *et al.*, 2004), a liberação de mediadores através da ativação dos receptores de proteína-G (PERIANIN; SNYDERMAN, 1989;

HIGASHIJIMA; ROSS, 1991), a estimulação da fosfolipase A₂ e C, a mobilização de Ca²⁺ para o retículo sarcoplasmático (NAKAJIMA, 1986) e seu envolvimento na morte celular por necrose ou apoptose (PERIANIN; SNYDERMAN, 1989).

Peptídeos quimiotáticos também presentes no veneno de vespas, induzem a quimiotaxia em alguns tipos de células (HABERMANN, 1972) e liberam histamina dos mastócitos (NAKAJIMA *et al.*, 1985). Recentemente, caracterizou-se estrutural e funcionalmente uma nova toxina peptídica isolada do veneno da vespa social *Polybia paulista*, Polybia-CP, que apresenta reduzida atividade degranuladora e de lise de mastócitos, como é esperado para a maioria dos peptídeos quimiotáticos dos venenos de vespas. Este peptídeo também apresenta baixa atividade hemolítica em eritrócitos de ratos (de SOUZA *et al.*, 2005).

Outros peptídeos como as cininas (bradicinina e seus homólogos) também foram observados no veneno de vespas. Suas propriedades farmacológicas são caracterizadas por ação hipotensiva, além da capacidade de causar contração em músculo liso de diferentes tecidos (NAKAJIMA *et al.*, 1985).

A atividade neurotóxica da peçonha de vespas é bastante conhecida e indica a presença de uma variedade de toxinas com ação no sistema nervoso (PIEK, 1991). Essa ação pode ser periférica (pré ou pós-sináptica) ou central, porém poucos são os estudos relacionados a esses peptídeos (SILVA, 2003).

1.2.3.3 Enzimas

Os principais componentes enzimáticos do veneno de vespas são a hialuronidase e as fosfolipases, que desempenham um importante papel como mediadores da inflamação e são responsáveis pelo efeito miotóxico e/ou neurotóxico (HABERMANN, 1972; HOFFMAN, 2006).

A atividade fosfolipásica varia muito de gênero para gênero. A fosfolipase A₂ é tida como um dos mais importantes alérgenos em venenos de vespídeos, embora alguns venenos contenham quantidades iguais de PLA e PLB (ROSEMBERG *et al.*,

1977; ABE *et al.*, 2000). A PLA₂, presente no veneno de vespas, é capaz de produzir vários efeitos farmacológicos, como por exemplo a contração do músculo liso e a hemólise *in vivo e in vitro* (EDERY *et al.*, 1978; OLIVEIRA; PALMA, 1998). A hialuronidase, outra enzima encontrada no veneno, não provoca ação localizada ou sistêmica, mas promove a difusão de outros constituintes tóxicos, por meio da despolimerização do ácido hialurônico (HABERMANN, 1972; ALLALOUF *et al.*, 1972).

1.3 Efeitos do veneno de vespas

As considerações sobre os acidentes envolvendo abelhas são aplicadas também às vespas, uma vez que possuem características comuns. A composição do veneno de vespas é pouco conhecida, porém seus principais alérgenos apresentam reações cruzadas com os das abelhas e também produzem fenômenos de hipersensibilidade (BRASIL, 2001).

Os venenos exercem efeitos em quase todas as células ou tecidos, sendo esses efeitos decorrentes da ação sinérgica ou aditiva de diferentes toxinas e enzimas presentes nos venenos (TAVARES, 2005).

A intensidade e o tipo de manifestação decorrentes do acidente provocado por himenópteros dependem de alguns fatores como sensibilidade da vítima, número de picadas recebidas simultaneamente, profundidade e localização da picada e espécie do agente causador do acidente. As manifestações clínicas decorrentes de um acidente por himenópteros podem ser de natureza alérgica ou tóxica (GRISOTTO *et al.*, 2006).

Dentre as principais manifestações clínicas encontram-se:

- Reações cutâneas: urticária, ulceração, edemas;
- Reações cardiovasculares e respiratórias: aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, taquipnéia, broncoespasmo e edema de glote;

- Reações gastrointestinais: náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia;
- Outras reações: cefaléia, hipertermia, calafrios, tonturas, desmaios e coma;

Também é observada a liberação de histamina a partir da degranulação de mastócitos e de catecolaminas a partir de células adrenais; pode ainda ser observado citólise, hemólise e quimiotaxia de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares para o local da ferroadada (HABERMANN, 1972; EDERY *et al.*, 1978; LORENZI, 2002).

Os acidentes vespídeos, em geral, têm curso benigno. Entretanto, eventualmente, podem surgir complicações mais graves como problemas cardíocirculatórios e possíveis alterações renais (HOFFMAN, 2006).

Estudos clínicos, após acidentes, com espécies de vespas, incluindo a *Polybia paulista*, evidenciaram comprometimento renal induzido pela ação do veneno, onde pode ser observado a presença de necrose tubular, nefrotoxicidade direta ou nefrite intersticial aguda por uma reação de hipersensibilidade (BHATTA *et al.*, 2005; GRISOTTO *et al.*, 2006; DAS; MUKHERJEE, 2008; D'CRUZ *et al.*, 2008).

1.4 Fisiologia Renal e Leito Vascular Mesentérico

1.4.1 Fisiologia Renal

Os rins são órgãos reguladores do volume e da composição dos líquidos corpóreos através de variações na excreção de água e eletrólitos (GUYTON; HALL, 2000). Cada rim contém aproximadamente um milhão de néfrons, unidades morfofuncionais, os quais são formados por glomérulo e túbulos renais. O glomérulo é constituído por um tufo de capilares fenestrados que emerge da arteríola aferente, e os túbulos renais constituídos por diferentes segmentos – túbulo contorcido

proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e túbulos ou ductos coletores. Cada segmento apresenta funções distintas e as células epiteliais possuem diferentes ultra-estruturas responsáveis pela secreção e reabsorção das mais variadas substâncias (JOHNSON, 2000).

O sangue entra em cada rim através da artéria renal, que se ramifica nas artérias interlobares, nas artérias arqueadas e artérias corticais radiais. As artérias de pequeno calibre, as arteríolas aferentes, levam o sangue aos capilares glomerulares, através dos quais ocorre a ultrafiltração. O sangue, então, deixa os capilares glomerulares através das arteríolas eferentes seguindo para os capilares peritubulares (BERNE *et al.*, 2004).

Os rins recebem cerca de 25% do débito cardíaco, sendo diretamente proporcional ao gradiente de pressão entre a artéria e a veia renal e inversamente proporcional à resistência fornecida pelas arteríolas. Portanto, o principal mecanismo para alterações no fluxo sanguíneo renal (FSR) é através de modificações na resistência arteriolar aferente ou eferente (COSTANZO, 2004). Tanto arteríolas aferentes quanto eferentes possuem inervação simpática, ocorrendo vasoconstrição pela ativação de receptores α -1 (STRASSER *et al.*, 1992).

A pressão arterial renal pode variar de 80 a 200mmHg mantendo o fluxo sanguíneo renal constante. Quando a pressão arterial renal aumenta, tanto o FSR como o ritmo de filtração glomerular (RFG) aumentam. Outras substâncias que alteram a resistência das arteríolas aferentes e eferentes são a angiotensina II e as prostaglandinas as quais exercem efeito vasoconstrictor e vasodilatador, respectivamente (COSTANZO, 2004).

A mácula densa, determina a concentração de eletrólitos do filtrado que deixa a alça de Henle, enviando um sinal químico à arteríola aferente quando a concentração de eletrólitos é muito alta. A arteríola aferente, então, sofre vasoconstrição, a pressão hidrostática e o fluxo sanguíneo se reduzem, e o ritmo de filtração glomerular decresce, ocorrendo à auto-regulação (MANICA, 2004). Os mecanismos responsáveis por essa regulação da resistência arteriolar aferente são desconhecidos (JOHNSON, 2000).

O RFG é determinado pelo *clearance* de um marcador glomerular que deve ser livremente filtrado através dos capilares glomerulares; não ser reabsorvido ou secretado pelo túbulo renal e, quando em infusão, não altere o ritmo de filtração glomerular. O marcador glomerular ideal é a inulina, um polímero de frutose com peso molecular de aproximadamente 5.000 daltons que não se liga às proteínas plasmáticas e é livremente filtrada através da parede do capilar glomerular passando completamente inerte pelo túbulo renal. Assim, a quantidade de inulina filtrada é exatamente igual à quantidade excretada na urina (BERNE *et al.*, 2004).

A filtração glomerular resulta na produção de grandes quantidades de ultrafiltrado do plasma, cerca de 180 L/dia. O mecanismo de reabsorção nas células epiteliais do túbulo renal, então, transfere estas substâncias à circulação (BERNE *et al.*, 2004). O controle hormonal auxilia a regulação dos volumes de líquidos corporais e concentração de soluto exercidos pelos rins. Os principais hormônios envolvidos neste controle são aldosterona (que atua em nível distal aumentando a reabsorção de sódio e água); a angiotensina II (atua da mesma forma que a aldosterona, mas em nível proximal); o hormônio antidiurético (promove a reabsorção de água no túbulo coletor) e o peptídeo natriurético atrial (secretado pelos átrios em resposta a um aumento da pressão arterial, promovendo relaxamento do músculo liso vascular e diminuindo a reabsorção de sódio e água). Além destes, o hormônio paratireoideo atua em diferentes regiões do néfron regulando as concentrações de fosfato e cálcio (GUYTON; HALL, 2000; COSTANZO, 2004).

1.4.2 Fisiologia de Leito Vascular Mesentérico

Cada órgão apresenta uma microcirculação organizada de forma a atender suas necessidades. Em geral, cada artéria ao entrar no órgão, se ramifica em arteríolas com diâmetro interno inferior a 20 μ m. As arteríolas, então, ramificam-se progressivamente até atingir 5 - 9 μ m, suprindo, assim, sangue para os capilares (COSTANZO, 2004).

O leito vascular mesentérico irriga a região esplâncnica conduzindo o sangue através da arteríola para uma série de metarteríolas (arteríolas terminais) que levam

o sangue aos capilares preferenciais (calibrosos) e verdadeiros (delgados) de onde retorna para a circulação geral através das vênulas. As metarteríolas não apresentam capa muscular contínua, mas apenas fibras musculares lisas que circundam o vaso em pontos intermitantes (GUYTON; HALL, 2000).

O músculo liso nas paredes das arteríolas é tonicamente ativo (sempre contraído) e extremamente inervado por fibras nervosas adrenérgicas simpáticas. Os receptores α -adrenérgicos são encontrados nas arteríolas de vários leitos vasculares (pele e vasculatura esplâncnica) e, quando ativados, causam contração do músculo liso vascular, produzindo uma diminuição no diâmetro da arteríola e aumentando sua resistência ao fluxo de sangue (BERNE *et al.*, 2004).

Variações no fluxo de sangue a um dado órgão são alcançadas pela alteração da resistência arteriolar. Os mecanismos que regulam o fluxo aos vários órgãos são classificados como controle local (intrínseco) e controle neural ou hormonal (extrínseco). O controle local é exercido pela ação direta de metabólitos locais sobre a resistência arteriolar, enquanto o controle neural inclui mecanismos como a ação do sistema nervoso simpático sobre o músculo liso vascular e ações de substâncias vasoativas, como histamina, bradicinina e prostaglandinas (COSTANZO, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

As pesquisas realizadas até o presente momento sobre a estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação do veneno de *Hymenoptera*, evidenciam a presença de efeitos importantes sob o ponto de vista médico, farmacológico e imunológico (OLIVEIRA, 2000). A grande maioria das mortes causadas por ferroadas por insetos desta ordem está diretamente relacionada ao desencadeamento de reações imunológicas, porém algumas se devem à toxicidade direta do veneno (LORENZI, 2002).

Mesmo conhecendo os venenos de *Hymenoptera* desde o século XIX e sabendo do grande número de espécies de vespas em regiões do Brasil, muito pouco é conhecido e estudado sobre a composição do veneno destes insetos, como a vespa *Polybia paulista*. Este conhecimento toxinológico limitado, cria muitas dificuldades no manejo adequado das vítimas.

Considerando a escassez de dados na literatura sobre a espécie *Polybia paulista* e seu veneno, faz-se necessário um estudo objetivando conhecer os seus efeitos renais e vasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito renal e vascular do veneno da vespa *Polybia Paulista* visando à descoberta de ferramentas farmacológicas e/ou substância de valor terapêutico.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito do veneno total da vespa *Polybia paulista* em rim isolado;
- Estudar o efeito do veneno total da vespa *Polybia paulista* em células tubulares renais;
- Determinar a ação do veneno total sobre a viabilidade e proliferação da linhagem celular MDCK;
- Avaliar as alterações morfológicas celulares;
- Estudar o efeito do veneno total da vespa *Polybia paulista* em leito vascular mesentérico;
- Estudar o efeito do veneno total da vespa *Polybia paulista* em anel de aorta isolada;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET); Fisiologia do Músculo Liso do Instituto de Biomedicina (IBIMED) da Faculdade de Medicina e no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 250 e 300g provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em ambientes limpos e secos, com luminosidade, temperatura e umidade adequada, com e água “*ad libitum*”.

4.2 Veneno, células e substâncias utilizadas

O veneno total da vespa *Polybia paulista* (VPp) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcos H. Toyama (Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista). As células MDCK também foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dra. Julia Manso (Departamento de Bioquímica, Universidade São Paulo – USP). As substâncias e sais utilizados para realização do estudo foram obtidos da empresa Sigma (EUA).

4.3 Perfusão de rim isolado

4.3.1 Sistema Utilizado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. Esse sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983; MONTEIRO; FONTELES, 1999) composto por dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado para perfusão *in vitro*. Esse

sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina (em menor quantidade) na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, além de possuir uma oxigenação (95% O₂/ 5% CO₂) adaptada ao próprio sistema (Figuras 6 e 7).

O sistema utilizado é constituído pelos seguintes componentes:

- ❖ **Banho-maria** - para a manutenção da temperatura constante do pulmão tipo silástico entre 36 e 37 °C.
- ❖ **Bomba aquecedora com termostato** - para manutenção de uma temperatura constante no sistema entre 36 e 37 °C.
- ❖ **Bomba de perfusão de Watson** - bombeia a solução de perfusão ao longo do sistema.
- ❖ **Catabolhas** - evita a entrada de bolhas nos rins.
- ❖ **Coletor de urina** – frasco que coleta a urina.
- ❖ **Condensador** – reservatório da solução perfusora.
- ❖ **Filtro Millipore 5 µm** – filtra a solução perfusora.
- ❖ **Fluxômetro** – para mensurar o fluxo de perfusão (mL/hora).
- ❖ **Manômetro de mercúrio** – para mensurar a pressão de perfusão (mmHg).
- ❖ **Pulmão tipo silástico** – promove as trocas gasosas (95% O₂ e 5%CO₂).
- ❖ **Seringa coletora** – seringa coletora de perfusato.

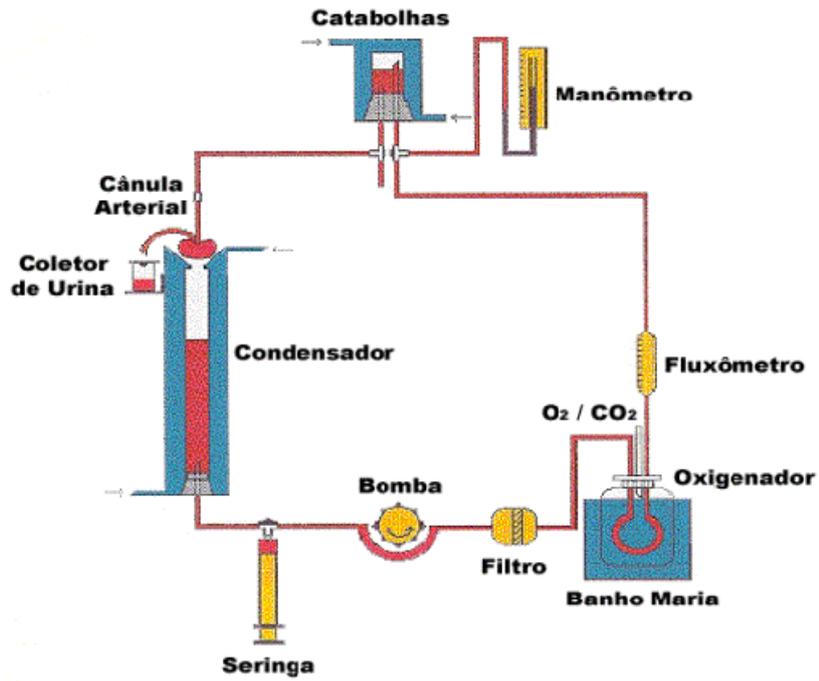


Figura 6 - Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado

Fonte: LAFAVET - UFC



Figura 7 - Foto do sistema de perfusão de rim isolado.

Fonte: LAFAVET - UFC.

4.3.2 Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos. Foi avaliado em cada uma das bombas (1 a 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um minuto (mL/min).

4.3.3 Solução perfusora

A solução perfusora utilizada foi a de Krebs-Henseleit, contendo albumina a 6g% dialisada por 48h antes do experimento para retirar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato e lactato (HANSON; BALLARD, 1968).

4.3.4 Técnica cirúrgica

Os animais (n=4) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/kg de peso corporal. Foi realizada a administração de manitol (3mL; 20 %) pela veia femural (figura 8), a fim de facilitar a fixação da cânula ao ureter, que em seguida foi canulado, através de um tubo de polietileno, para a coleta de urina (figura 9).

A artéria renal foi isolada (figura 10) e canulada (figura 11) através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (figura 12).



Figura 8 - Administração de manitol pela veia femural no animal anestesiado.

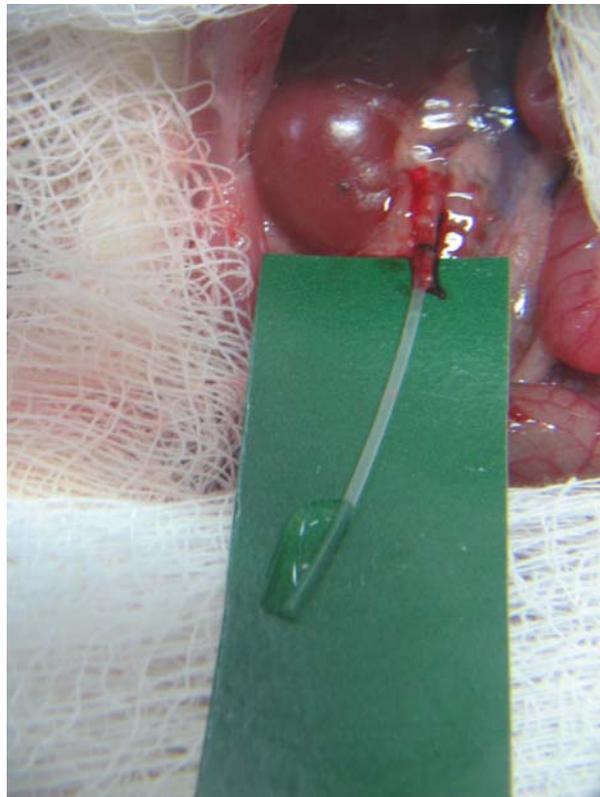


Figura 9 - Canulação do ureter.

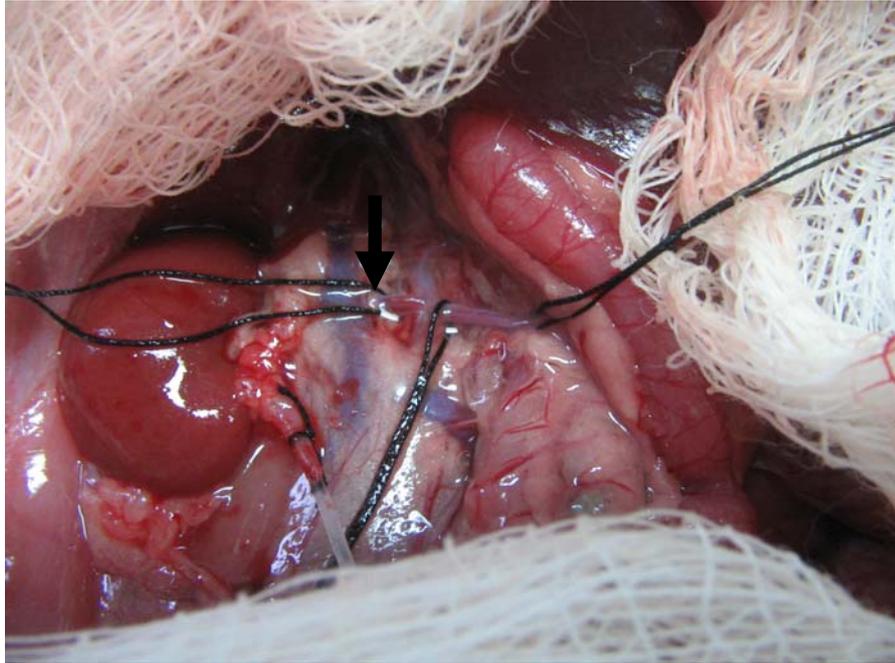


Figura 10 - Visualização da artéria renal.

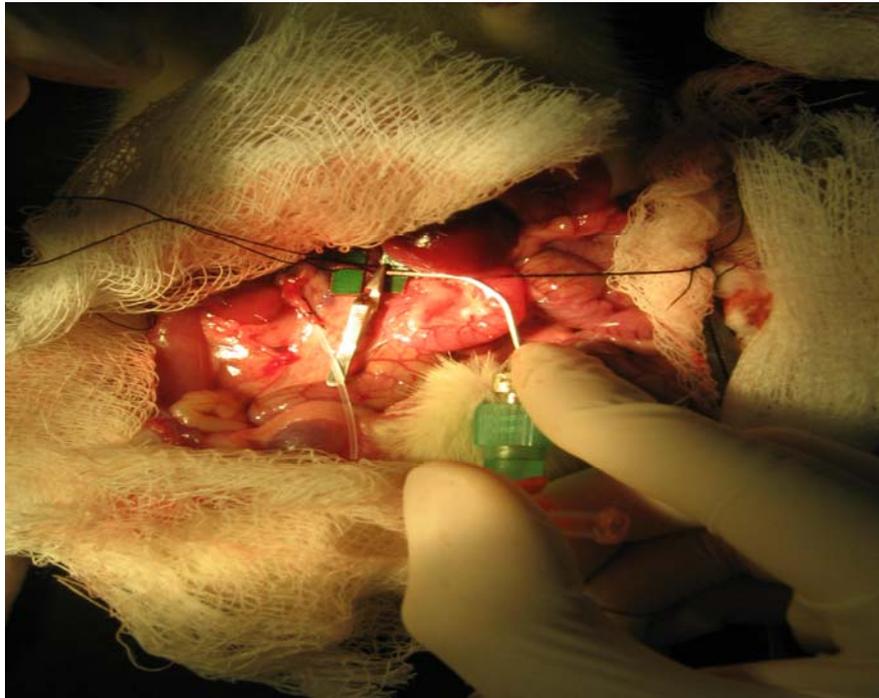


Figura 11 - Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.



Figura 12 - Fotografia do rim isolado no sistema de perfusão.

4.3.5 Grupos Experimentais

- Grupo controle: Rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada.
- Grupo tratado com veneno da *vespa Polybia Paulista* na concentração $1\mu\text{g/mL}$ (0,1mg em 100mL).
- Grupo tratado com veneno da *vespa Polybia Paulista* na concentração $3\mu\text{g/mL}$ (0,3mg em 100mL).

4.3.6 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 minutos iniciais foram utilizados como controle interno. Após este período o veneno da *Polybia paulista* foi adicionado ao sistema

para avaliação dos efeitos sobre a pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio (%TNa⁺), potássio (%TK⁺) e cloreto (%TCl⁻). Para tanto, a cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. As amostras do perfusato e da urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal.

4.3.7 Análises bioquímicas dos perfusatos e urinas

As dosagens de sódio, potássio e cloreto foram realizadas utilizando aparelho de íons eletrodos seletivos (*Rapid Chem 744, Bayer diagnostic*); a inulina determinada por leituras fotométricas em espectrofotômetro de chama (*Flame Photometer*) seguindo método descrito por Fonteles e col (1983); e a osmolaridade através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer – modelo 5520 ESCOR*).

4.3.8 Cálculo dos parâmetros funcionais renais

O quadro 1 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

Quadro 2 - Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renal

<p>1. FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo urinário FU = (Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo) x 10 (admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água)</p>
<p>2. PP (mmHg) = Pressão de perfusão. Leitura em manômetro</p>
<p>3. RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Ritmo de filtração glomerular RFG = (DOU in / DOP in x FU) sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato</p>
<p>4. FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo de perfusão renal (registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)</p>
<p>5. RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistência vascular renal RVR = PP (mmHg) / FPR</p>
<p>6. FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio filtrado FNa⁺ = RFG x PNa⁺ (PNa⁺ = Concentração de sódio no perfusato)</p>
<p>7. ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio excretado ENa⁺ = FU x UNa⁺ (UNa⁺ = Concentração de sódio na urina)</p>
<p>8. TNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio transportado TNa⁺ = FNa⁺ - ENa⁺</p>
<p>9. %TNa⁺ = Percentual de sódio transportado %TNa⁺ = TNa⁺ x 100 / FNa⁺</p>
<p>10. FK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio filtrado FK⁺ = RFG x PK⁺ (PK⁺ = concentração de potássio no perfusato)</p>
<p>11. EK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio excretado EK⁺ = FU x UK⁺ (UK⁺ = Concentração de potássio na urina)</p>
<p>12. TK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Potássio transportado TK⁺ = FK⁺ - EK⁺</p>
<p>13. %TK⁺ = Percentual de potássio transportado %TK⁺ = TK⁺ x 100 / FK⁺</p>
<p>14. TCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Cloreto transportado TCl⁻ = FCl⁻ - ECl⁻</p>
<p>15. % TCl⁻ = Percentual de cloreto transportado % TCl⁻ = TCl⁻ x 100 / FCl⁻</p>
<p>16. FCl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Cloreto filtrado F Cl⁻ = RFG x P Cl⁻ (PNa⁺ = Concentração de sódio no perfusato)</p>
<p>17. ECl⁻ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Cloreto excretado E Cl⁻ = FU x UCl⁻ (UNa⁺ = Concentração de sódio na urina)</p>
<p>18. Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance osmótico [Uosm / Posm] x FU (onde Uosm = Osmolaridade urinária e Posm = Osmolaridade do perfusato)</p>

4.3.9 Estudo Histológico

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim direito (perfundido) e do rim esquerdo (não perfundido), os quais foram armazenados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram desidratação, diafanização e em seguida, cortados em uma espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (Nikon). Foi também realizado o estudo histológico nos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle perfundido).

4.4 Ensaios com cultura de células renais

4.4.1 Cultivo e tratamento das células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)

O cultivo das células foi realizado em frascos plásticos para cultura (75m², volume de 250mL) e o meio de cultura usado foi o RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% v/v de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂, sendo observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão. Antes de cada experimento as células foram armazenadas em meio sem SBF por 24h para a obtenção de células na fase G₀ do ciclo celular. Para cada experimento foi removido o meio de cultura e as mesmas incubadas com tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) a 37°C por aproximadamente 10 min. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com SBF. A suspensão foi então centrifugada a 200g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células re-suspensas em meio de cultura. As células foram então quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas (1x10⁵ céls/poço) permitindo o crescimento confluyente por 2h. As células foram avaliadas na presença de diferentes concentrações do veneno em estudo (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/mL), solubilizados em PBS estéril, pH 7.4. Após esse período foram realizados ensaios de viabilidade celular (figura 13).

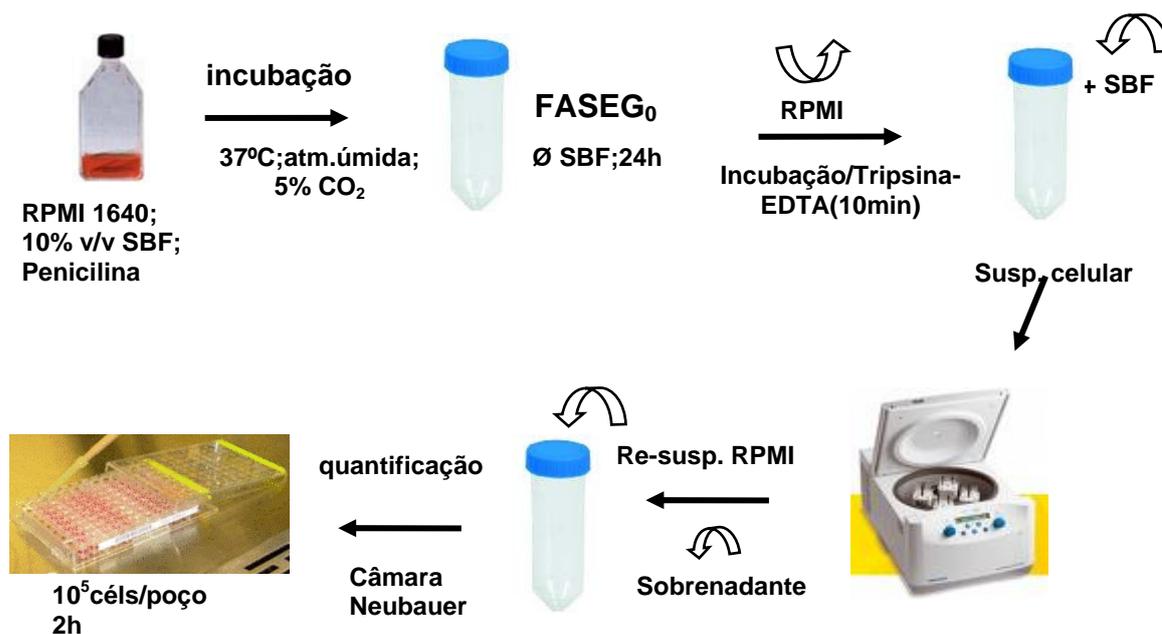


Figura 13 - Esquema simplificado do cultivo e tratamento das células MDCK.

Fonte: PRACIANO, 2009.

4.4.2 Ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular

Para determinação da viabilidade celular foram usados dois métodos distintos e complementares.

4.4.2.1 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

As células MDCK foram adicionadas as placas de 96 poços com densidade de 1×10^5 e tratadas com diferentes concentrações do veneno da vespa *Polybia paulista* por 24 horas. Após o tratamento das células o substrato de cultura foi retirado e então adicionado 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT; Sigma) dissolvido em PBS. Este método baseia-se na atividade mitocondrial das células viáveis que são capazes de reduzir o MTT e formar um produto colorido insolúvel em água, o sal formazan. Após incubação por 4 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e então adicionado dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram incubadas por 17h e em seguida realizadas a leitura em espectrofotômetro (570nm),

como demonstrado na figura 14. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicada (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células sobreviventes e a concentração de veneno. Controle negativo correspondeu como 100% de sobrevivência.

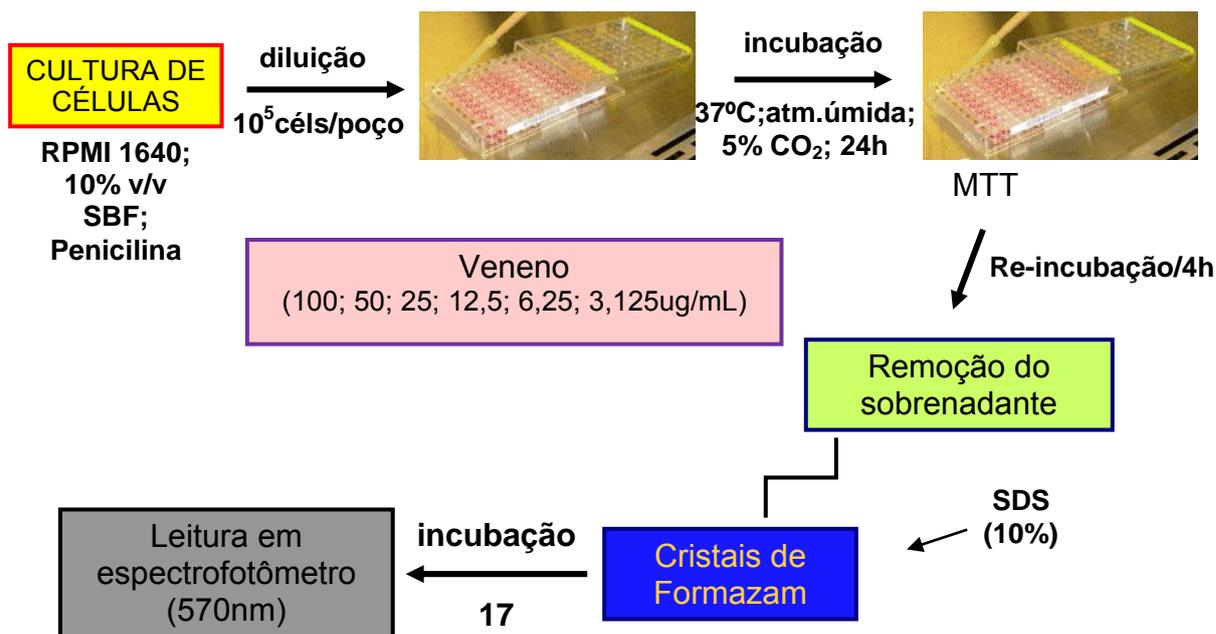


Figura 14 - Esquema simplificado dos ensaios de viabilidade e proliferação celular

Fonte: PRACIANO, 2009.

4.4.2.2 Concentração inibitória média (CI_{50})

A citotoxicidade foi estimada, por curva de interpolação, como a concentração do veneno capaz de inibir 50% das células, correlacionando a média do percentual de células mortas com a concentração de veneno e examinadas por análise de regressão não-linear utilizando programa GraphPad Prism 5.

4.4.3 Ensaio para determinação da lactato desidrogenase (LDH)

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de liberação da enzima lactato desidrogenase. Esta enzima é responsável pela redução do piruvato a lactato na presença do NADH. Uma vez que esta enzima é de origem citoplasmática, a sua presença no meio extracelular pode indicar alteração na integridade da membrana plasmática. Foi adicionado 1 mL do reagente a 20 µL do sobrenadante e, foram realizadas leituras das absorbâncias em 1 e 2 minutos. O decréscimo da absorbância é proporcional a atividade da enzima. Os testes foram realizados utilizando o reagente analítico Labtest LDH Liquiform e foram seguidas as instruções do fabricante. A atividade da LDH foi determinada a partir da fórmula abaixo:

$$\text{Atividade LDH (U/L)} = \frac{(\text{Absorbância 1} - \text{Absorbância 2})}{2} \times F$$

F é o fator do reagente informado pelo fabricante.

4.5 LEITO MESENTÉRICO

Ratos Wistar machos (n=4), pesando entre 250 e 300 g, foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico (50 mg/Kg). Depois de aberto o abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi isolada (figura 15) e canulada (figura 16) utilizando um tubo de polietileno (PE-20). O intestino foi separado do leito mesentérico com o ligamento do leito (figura 17) nas extremidades intestinais (duodeno e ceco). O mesentério isolado (figura 18) foi, então, perfundido em sistema aberto (figura 19 e 20) com solução de Krebs contendo: com composição (g/L): 114,0mM de NaCl; 4,96mM de KCl; 1,24mM de KH₂PO₄; 0,5mM de MgSO₄.7H₂O; 24,99mM de NaHCO₃; 2,10mM de CaCl₂. 2H₂O; e 3,60mM de glicose (MCGREGOR, 1965).



Figura 15 - Isolamento da artéria mesentérica.

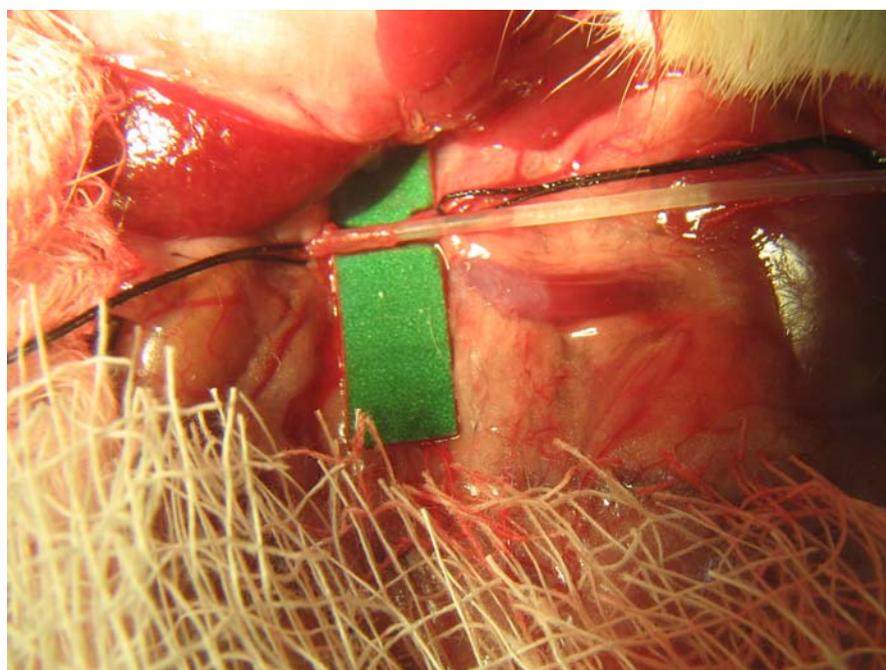


Figura 16 - Canulação da artéria mesentérica.



Figura 17 - Leito vascular mesentérico ainda ligado ao intestino do animal.



Figura 18 - Leito vascular mesentérico isolado e acoplado ao sistema.

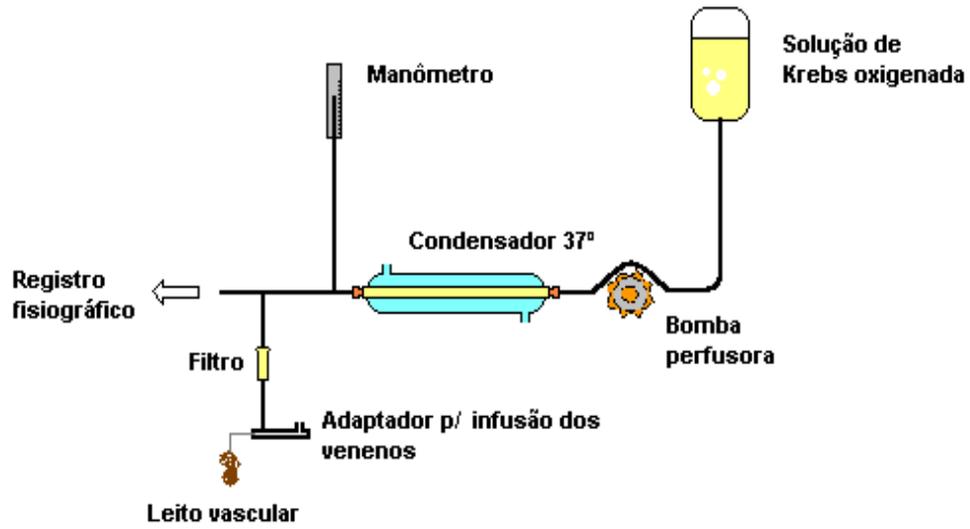


Figura 19 - Representação gráfica do sistema de perfusão.

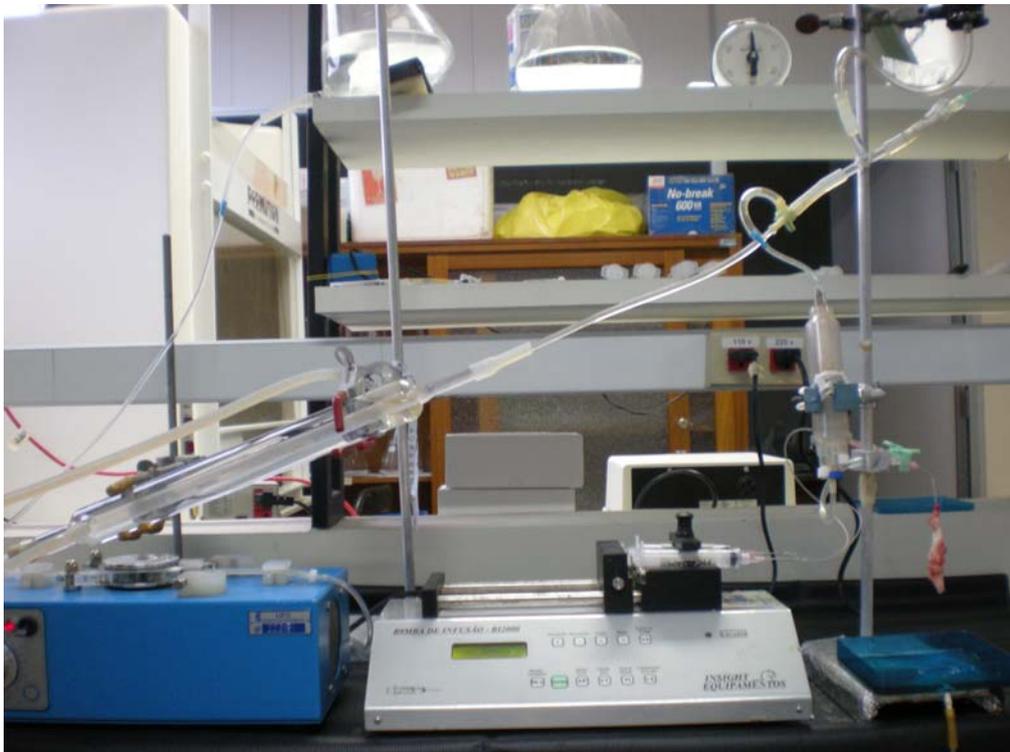


Figura 20 - Foto do sistema de perfusão do leito mesentérico.

O sistema foi mantido em temperatura constante de 37 °C e o leito foi perfundido a uma pressão de 40mmHg, enquanto a mesma foi mensurada pela média das pressões de perfusão através de um transdutor Edwards® conectado ao sistema. A captação dos dados foi realizada digitalmente (frequência de amostragem de 1Hz) por um equipamento periférico (Aisha 4) da empresa Kananda®. As variações na pressão de perfusão foram continuamente registradas pelo software da Windaq®.

Para verificar a atividade do veneno, bem como a viabilidade do órgão, o veneno da *Polybia paulista* (3,10 e 100 µg/mL) e a fenilefrina 6µM foram infundidos na preparação a um fluxo de 0,1mL por minuto. Os experimentos foram iniciados com uma pressão basal entre 20 e 40 mmHg. O tempo de infusão das substâncias testadas foi sempre de 1 hora.

4.6 Ensaio em anel de aorta

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foi feita uma incisão no tórax do animal, extirpados os pulmões e o coração para visualização do segmento torácico da aorta (figura 21).



Figura 21 - Visualização do segmento torácico da aorta.

Após o procedimento cirúrgico, o segmento da aorta torácica foi removido (figura 22) e cortado transversalmente em segmentos cilíndricos como anéis (1mm x 5mm), que foram acoplados em peças triangulares de aço ligadas a um fio (figura 23). As preparações foram suspensas horizontalmente em cubas de volume de 5mL para órgãos isolados contendo solução de Tyrode modificada (figura 24) com a seguinte composição em mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl₂ 0,98; CaCl₂ 2,0; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 11,9 e glicose 5,5 (pH 7,4, mantida a 37°C). Os tecidos foram mantidos em uma tensão basal de 1g na cuba com a solução devidamente aerada.



Figura 22 - Segmento da aorta torácica isolada e devidamente dissecado.



Figura 23 - Anel da aorta acoplado em peças metálicas triangulares.

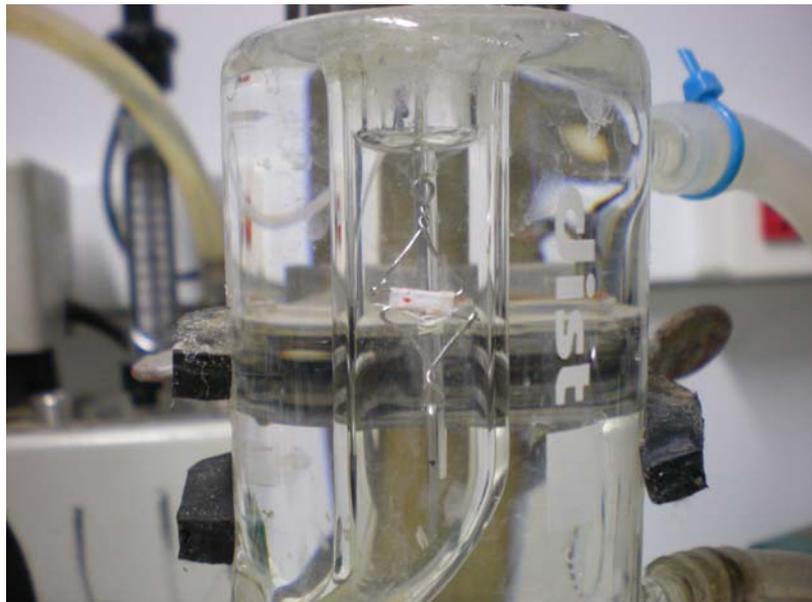


Figura 24 - Anel da aorta na cuba com solução de Tyrode devidamente aerada.

As contrações foram registradas isometricamente por transdutores de força, conectados a sistema de aquisição de dados (Dataq® PM-1000, EUA, figura 25 e 26).

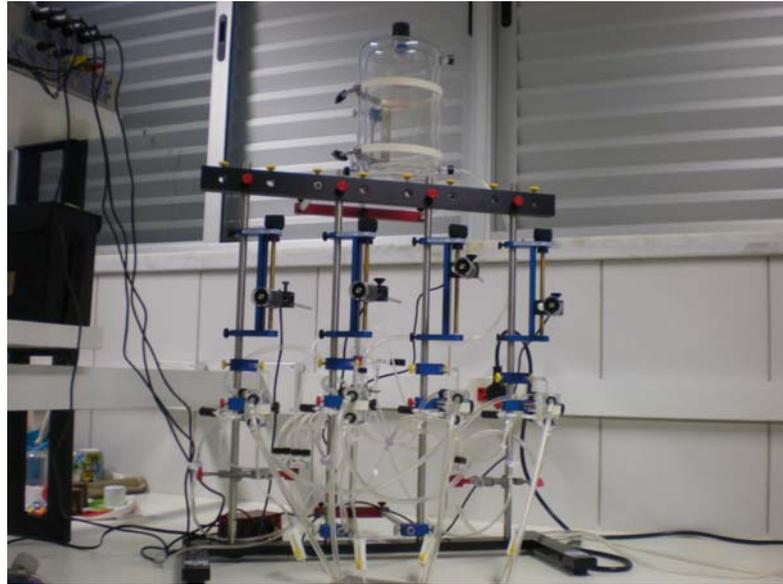


Figura 25 - Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolada de rato.

Fonte: Laboratório de Fisiologia do Músculo Liso

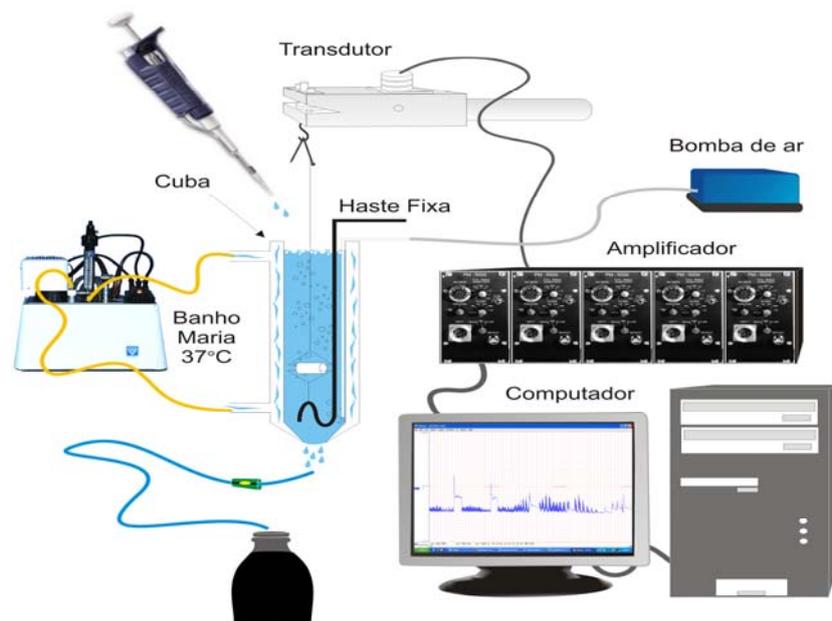


Figura 26 - Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados

Fonte: JUCA, 2007.

Após período de equilíbrio do tecido no sistema (aproximadamente 60 minutos), contrações foram induzidas por adição de potássio 60mM em três curvas adotadas como controle (teste de viabilidade do tecido).

4.6.1 Protocolos Experimentais

Foram realizados protocolos experimentais, nos quais foram utilizadas várias concentrações (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0µg/ml) do veneno da *Polybia paulista*. Esses protocolos são descritos a seguir.

4.6.1.1 Efeito do veneno de *Polybia paulista* na tensão basal

O efeito na tensão basal do músculo liso vascular com o endotélio intacto foi avaliado através da exposição dos anéis as concentrações crescentes do veneno.

4.6.1.2 Efeito do veneno *Polybia paulista* em meio livre de cálcio na presença de EGTA

Buscando analisar a influência do cálcio intracelular no efeito do veneno sobre os anéis de aorta, foram realizadas ensaios em meio ausente cálcio. Após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, em meio com solução de Tyrode normal, as preparações foram lavadas três vezes por três minutos com solução de Tyrode ausente de CaCl_2 e adicionado o agente quelante EGTA (1mM), garantindo a total retirada de cálcio do meio extracelular, seguida da adição do veneno.

4.6.1.3 Efeito do veneno *Polybia paulista* em meio com Fentolamina e Verapamil

Para verificar um provável mecanismo mediador da ação vascular do veneno, foram realizados ensaios em anéis de aorta com a administração de um bloqueador operado por voltagem (Verapamil 10 µM; n=04) e um antagonista α -

adrenérgico (Fentolamina 5 μ M; n=04), após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, seguida da adição do veneno.

4.7 Análise estatística

Os resultados em todos os experimentos foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas entre os grupos estudados foi verificada pelo teste *t* de Student, Análise de Variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni e Holm-Sidak. A análise estatística foi realizada utilizando os programas estatísticos GraphPad Prism 5.0, Sigma Plot ®9. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

4.8 Comitê de ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob o número 17/09 no dia 30 de setembro de 2008 (Anexo).

5 RESULTADOS

5.1 Perfusão de rim isolado

O veneno da vespa *Polybia paulista* (VPP) não apresentou alterações renais significativas na menor concentração estudada (1µg/mL), como demonstrado nas figuras 27-30.

Na concentração de 3µg/mL o veneno causou alterações em quase todos os parâmetros renais estudados. Foi observado um aumento significativo, aos 60, 90 e 120 minutos, na pressão de perfusão (PP), na resistência vascular renal (RVR), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG) quando comparados ao grupo controle no mesmo período (tabela 1/figura 27, tabela 2/figura 28, tabela 3/figura 29 e tabela 4/figura 30, respectivamente).

Foi observada uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) aos 60 minutos após a infusão do veneno da vespa *Polybia paulista* (3µg/mL), conforme demonstrado na tabela 5/figura 31. Foi também observado uma tendência a redução no percentual de transporte de cloreto (%TCl⁻), embora não foi significativa estatisticamente quando comparado com o controle. No entanto, o percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) permaneceu estável durante todo o experimento (tabela 6).

Tabela 1 - Pressão de perfusão (mmHg) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno da *Polybia paulista*.

Tempo (minutos)	30'	60'	90'	120'
Controle	110.1 ± 3.683	108.2 ± 4.881	108.6 ± 5.085	110.2 ± 3.692
VPp 1µg/mL	110.9 ± 1.840	109.7 ± 1.949	108.9 ± 1.989	112.4 ± 3.232
VPp 3µg/mL	111.6 ± 1.640	161.7 ± 4.624*	140.5 ± 1.714*	136.9 ± 2.466*

VPp: Veneno da *Polybia paulista*. Resultados expressos em média ± E.P.M. * p<0,05

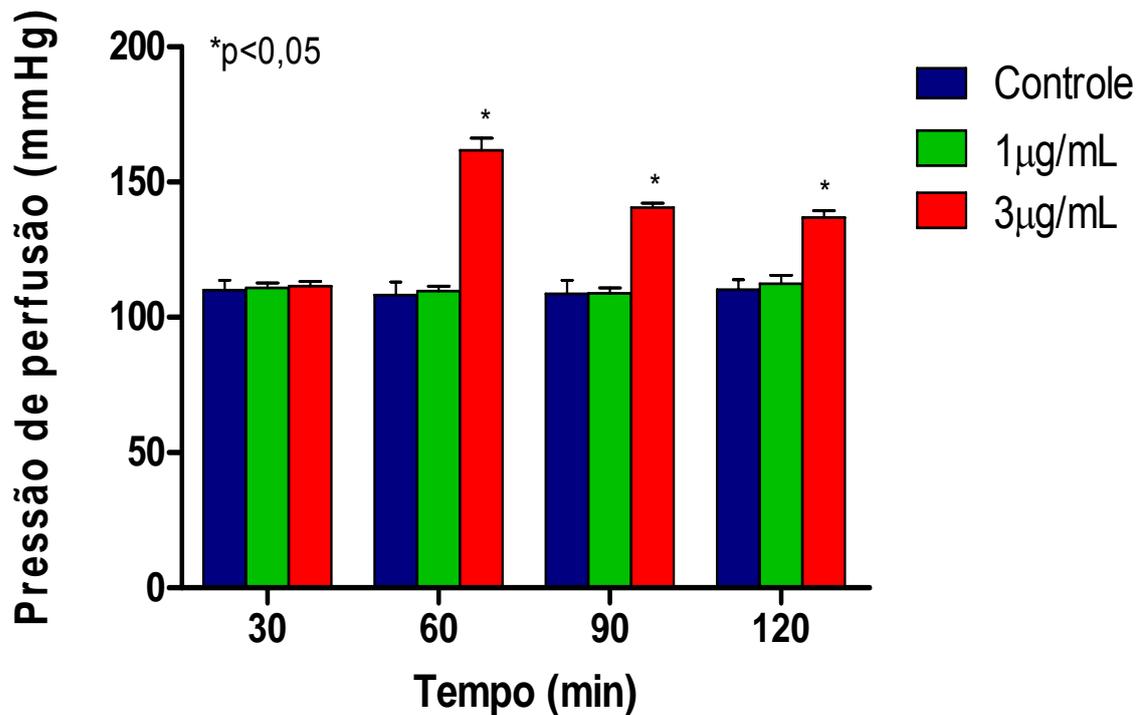


Figura 27 - Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controles e tratados com veneno da vespa *Polybia paulista* (VPp) nas concentrações de 1 e 3 µg/mL. Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05. Controle: Rim perfundido somente com solução de Krebs- Henseleit.

Tabela 2 - Resistência Vascular Renal ($\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) nos grupos controle ($n = 4$) e tratados ($n = 4$) com veneno da *Polybia paulista*.

Tempo (minutos)	30'	60'	90'	120'
Controle	5.95 ± 0.39	5.76 ± 0.44	5.80 ± 0.50	5.76 ± 0.41
VPp $1\mu\text{g/mL}$	5.77 ± 0.31	5.71 ± 0.30	5.68 ± 0.33	5.90 ± 0.42
VPp $3\mu\text{g/mL}$	6.07 ± 0.37	$8.74 \pm 0.50^*$	$7.59 \pm 0.39^*$	$7.42 \pm 0.45^*$

VPp: Veneno da *Polybia paulista*. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$

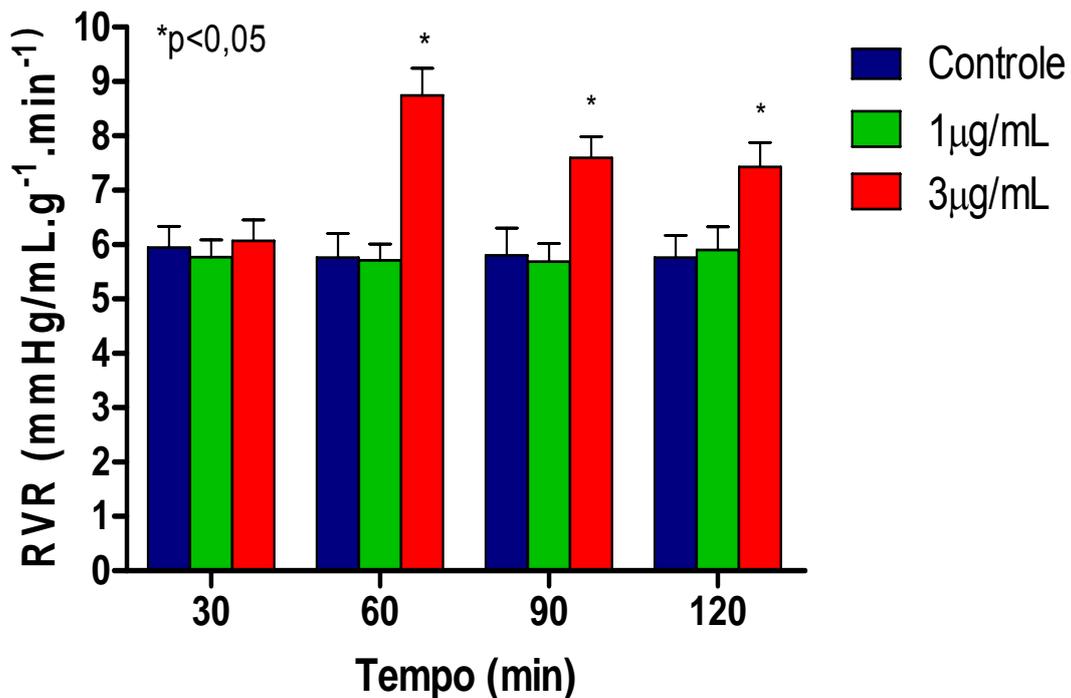


Figura 28 - Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controles e tratados com veneno de *Polybia paulista* (VPp) nas concentrações de 1 e $3\mu\text{g/mL}$. Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com $*p < 0,05$. Controle: Rim perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit.

Tabela 3 - Fluxo Urinário ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) nos grupos controle ($n = 4$) e tratados ($n = 4$) com veneno da *Polybia paulista*.

Tempo (minutos)	30'	60'	90'	120'
Controle	0.121 ± 0.008	0.135 ± 0.012	0.147 ± 0.011	0.141 ± 0.011
VPp $1\mu\text{g}/\text{mL}$	0.135 ± 0.010	0.144 ± 0.010	0.139 ± 0.014	0.143 ± 0.012
VPp $3\mu\text{g}/\text{mL}$	0.133 ± 0.010	$0.442 \pm 0.043^*$	$0.423 \pm 0.041^*$	$0.421 \pm 0.035^*$

VPp: Veneno da *Polybia paulista*. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$

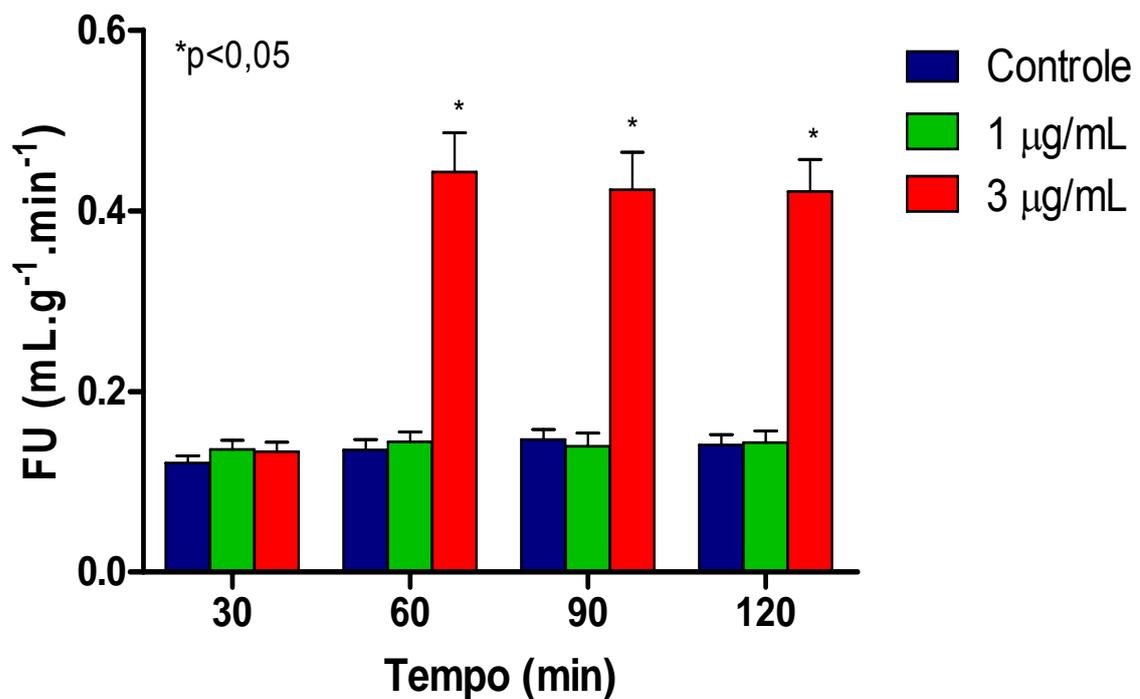


Figura 29 - Fluxo Urinário (FU) nos grupos controles e tratados com veneno de *Polybia paulista* (VPp) nas concentrações de 1 e $3\mu\text{g}/\text{mL}$. Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com $*p < 0,05$. Controle: Rim perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit.

Tabela 4 - Ritmo de Filtração Glomerular ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) nos grupos controle ($n = 4$) e tratados ($n = 4$) com veneno da *Polybia paulista*.

Tempo (minutos)	30'	60'	90'	120'
Controle	0.701 ± 0.073	0.707 ± 0.051	0.633 ± 0.051	0.697 ± 0.084
VPP $1\mu\text{g}/\text{mL}$	0.570 ± 0.075	0.555 ± 0.099	0.800 ± 0.183	1.138 ± 0.203
VPP $3\mu\text{g}/\text{mL}$	0.548 ± 0.063	$1.698 \pm 0.340^*$	$2.161 \pm 0.316^*$	$2.027 \pm 0.269^*$

VPP: Veneno da *Polybia paulista*. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$

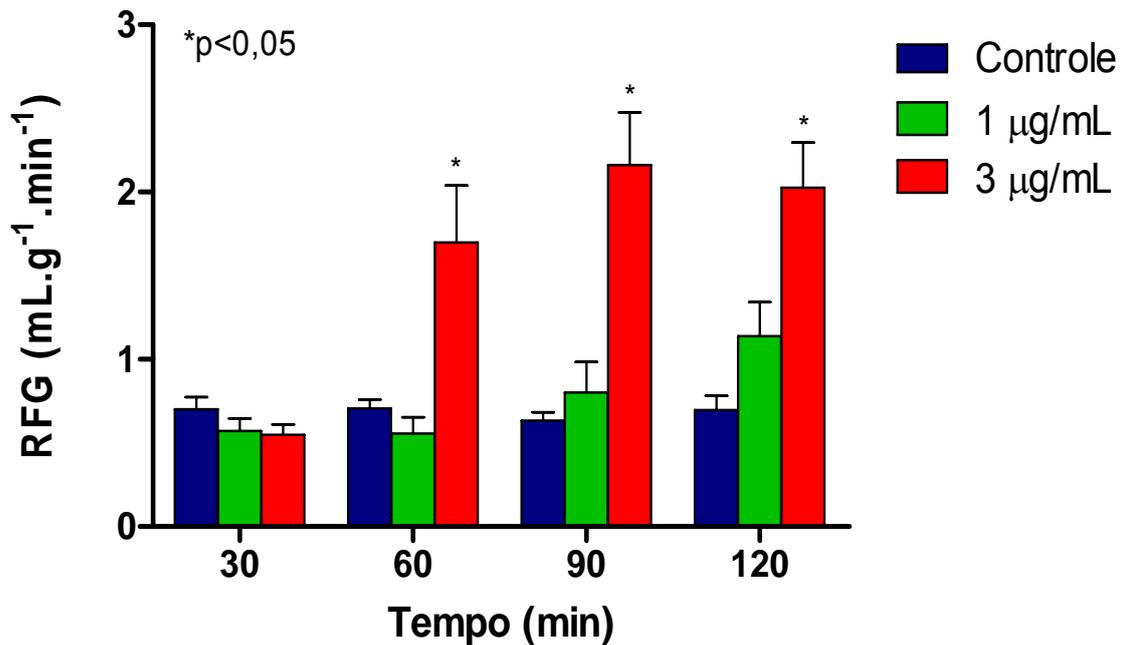


Figura 30 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controles e tratados com veneno de *Polybia paulista* (VPP) nas concentrações de 1 e 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com $*p < 0,05$. Controle: Rim perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit.

Tabela 5 - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno de *Polybia paulista* (VPp) nas concentrações de 1µg/mL e 3µg/mL.

Tempo (minutos)	30'	60'	90'	120'
Controle	80.66 ± 1.09	80.52 ± 1.15	80.52 ± 1.06	81.15 ± 0.53
VPp 1µg/mL	79.09 ± 1.63	76.54 ± 2.36	79.54 ± 3.77	85.15 ± 3.33
VPp 3µg/mL	79.02 ± 3.08	68.00 ± 4.40*	74.19 ± 4.66	72.35 ± 5.16

VPp: Veneno da *Polybia paulista*. Resultados expressos em média ± E.P.M. * p<0,05

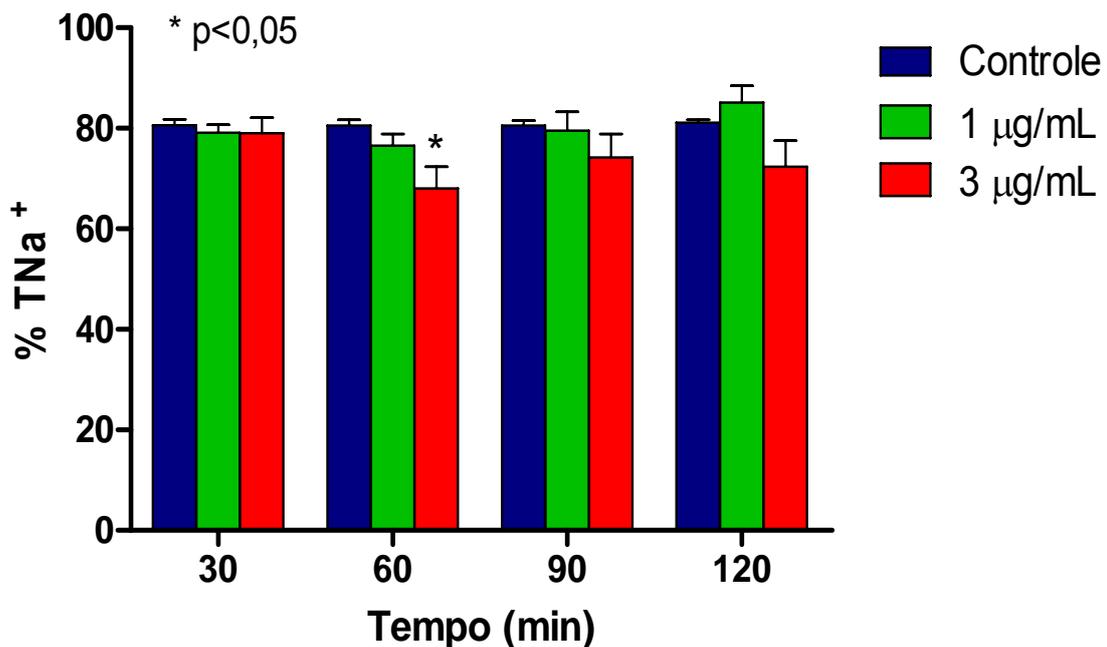


Figura 31 - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controles e tratados com veneno de *Polybia paulista* (VPp) nas concentrações de 1 e 3 µg/mL. Valores comparados ao controle nos mesmos períodos com *p<0,05. Controle: Rim perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit.

Tabela 6 - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) e Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n = 4) e tratados (n = 4) com veneno de *Polybia paulista* (VPp) nas concentrações de 1µg/mL e 3µg/mL.

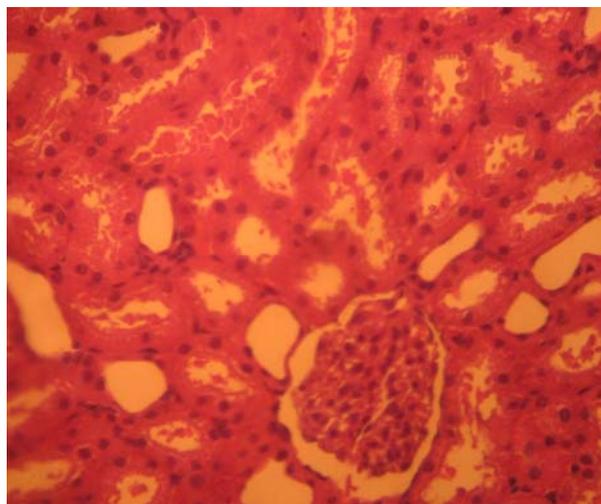
Parâmetros renais/ Min	30'	60'	90'	120'
%TK ⁺				
Controle	69.13 ± 4.14	69.04 ± 5.68	71.84 ± 4.21	69.94 ± 6.86
VPp (1µg/mL)	61.91 ± 2.29	50.60 ± 5.48	60.60 ± 7.06	77.01 ± 4.34
VPp (3µg/mL)	62.62 ± 3.62	58.54 ± 5.00	71.48 ± 5.00	70.81 ± 5.40
%TCl ⁻				
Controle	78.81 ± 1.25	80.18 ± 2.90	81.25 ± 1.20	80.49 ± 2.47
VPp (1µg/mL)	75.88 ± 1.83	72.93 ± 2.75	77.00 ± 4.19	83.66 ± 3.60
VPp (3µg/mL)	71.84 ± 3.66	70.10 ± 5.25	73.35 ± 5.39	67.31 ± 6.01

VPp: Veneno da *Polybia paulista*. Os dados representam a média ± E.P.M (* p<0,05).

5.2 Análises Histológicas

As lâminas analisadas demonstraram que os rins esquerdos utilizados como controle possuíam estruturas normais (glomérulos, túbulos, vasos e interstícios) (figura 32 A). O rim controle direito perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit, também não apresentou alterações (figura 32 B).

A



B

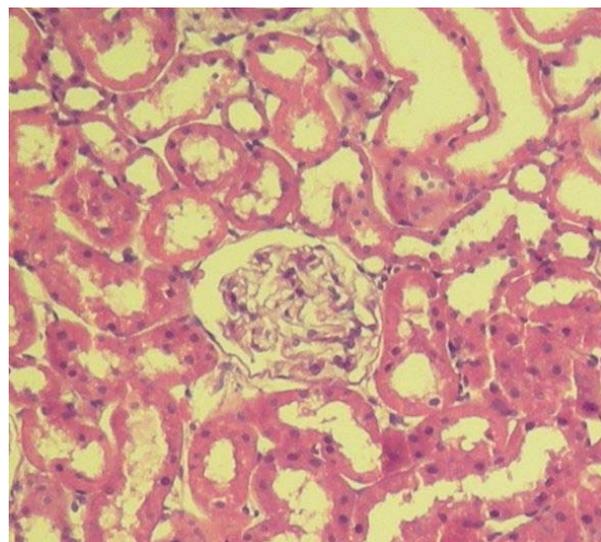


Figura 32 - A. Fotomicrografia de rim esquerdo demonstrando túbulos e glomérulos normais. **B.** Corte histológico de rim direito perfundido somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (coloração de hematoxilina-eosina; Aumento 400x).

Os rins perfundidos com 1 μ g/mL do veneno de *Polybia paulista* apresentou glomérulos e túbulos normais. Na avaliação histológica dos rins perfundidos com 3 μ g/mL do veneno foi observada uma moderada quantidade de material protéico nos túbulos e espaços urinários quando comparado ao controle (figura 33).

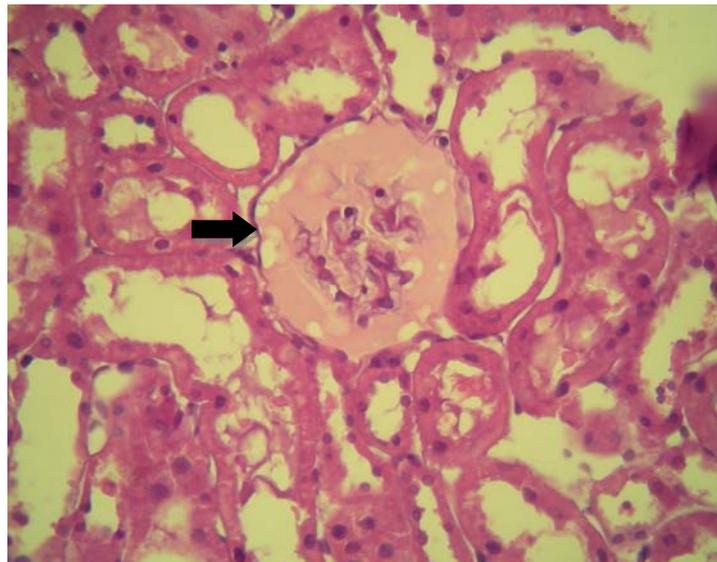
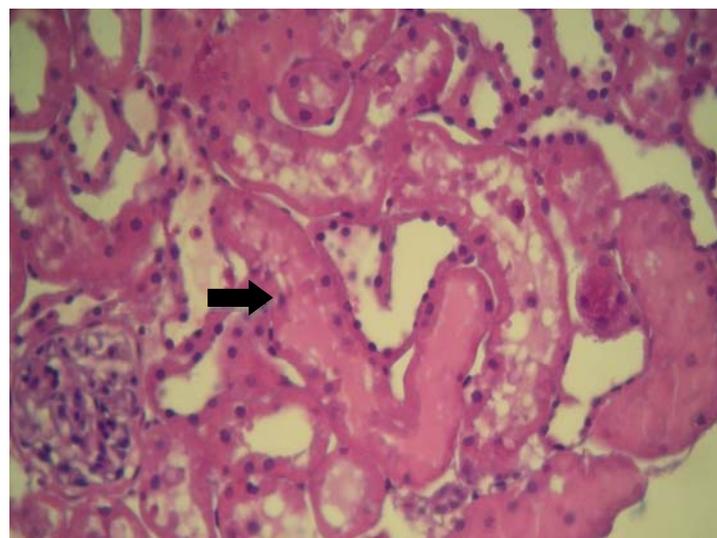
A**B**

Figura 33 - Fotomicrografia de rim perfundido com veneno de *Polybia paulista* (VPp) na concentração de 3 μ g/mL. **A**: Glomérulos; **B**: túbulos renais. Depósito de Material protéico nos espaços urinários e luzes tubulares (coloração de hematoxilina-eosina; aumento 400x).

Foram também observados focos de necrose/apoptose tubular de forma muito discretas em rins perfundidos com 3 μ g/mL de veneno da vespa *Polybia paulista* (figura 34).

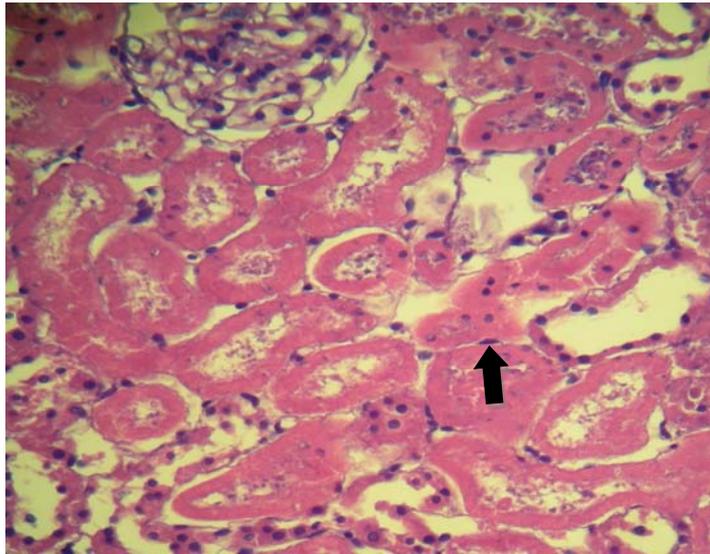
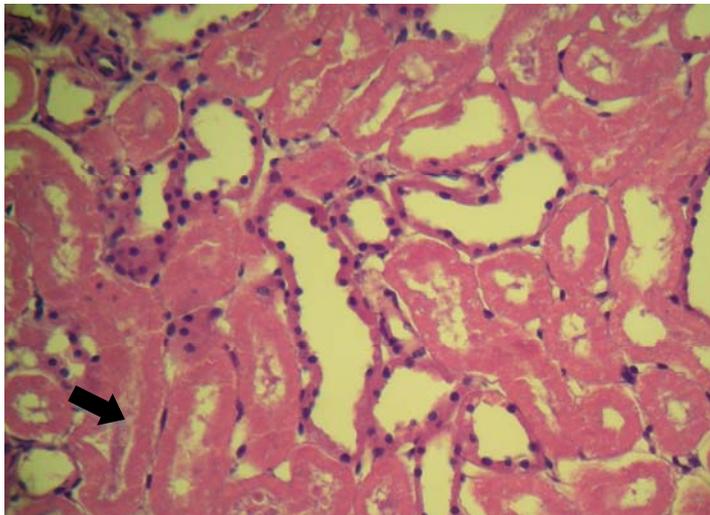
A**B**

Figura 34 - Fotomicrografia de rins perfundidos com veneno de *Polybia paulista* (VPp) na concentração de 3 μ g/mL, onde são observados pontos focais de necrose/apoptose. **A**: Núcleos Picnóticos; **B**: células anucleadas (coloração de hematoxilina-eosina; aumento 400x).

5.3 Efeitos do veneno da *Polybia paulista* em células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)

O efeito do veneno da *Polybia paulista* nas células tubulares renais foi avaliado através de culturas de células MDCK. A viabilidade das culturas tratadas ($1,0 \times 10^5$ / poço) com o veneno (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) foi analisada pelo método MTT após 24h de incubação. Os resultados demonstraram um efeito citotóxico dependente da concentração do veneno, com valor da CI_{50} 25.81 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35) e visíveis alterações morfológicas, tais com agrupamento celular, citoplasma granuloso e lise celular (Figura 36, 37 e 38).

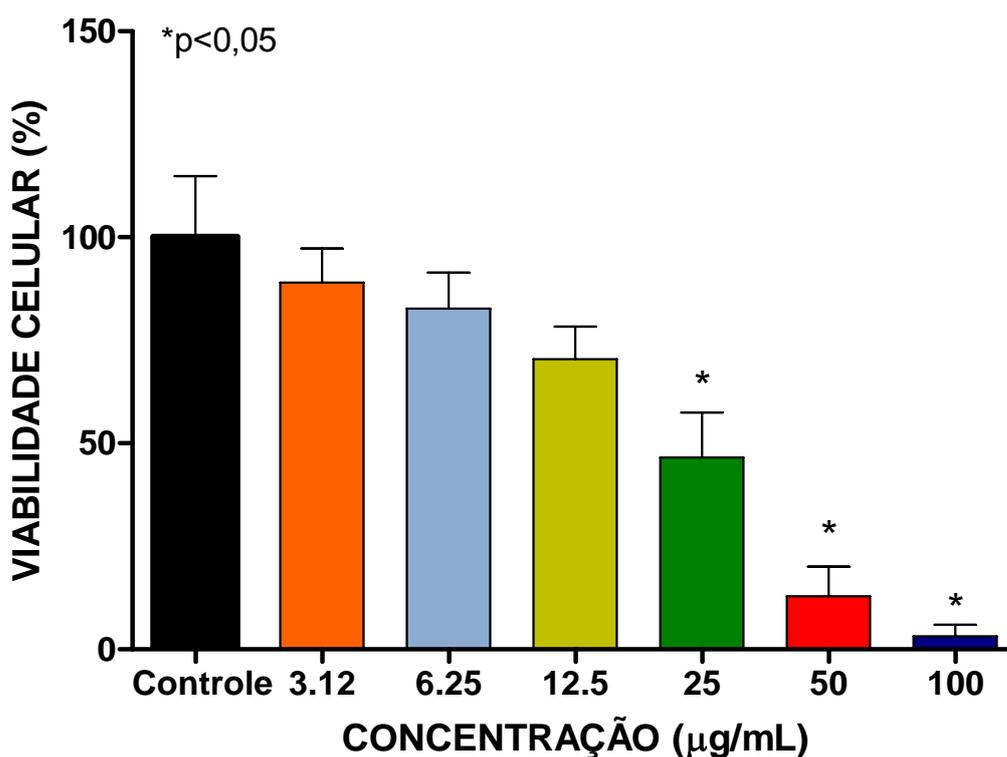
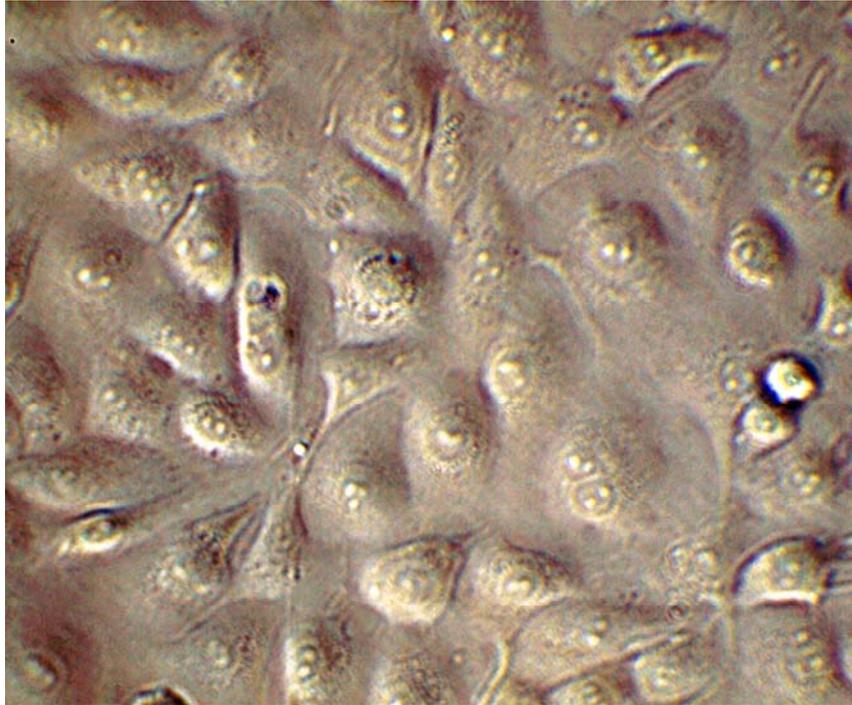


Figura 35 - Efeito do veneno da *Polybia paulista* em células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK). Valores expressos em média \pm E.P.M. Para análise estatística foi usada a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

A



B

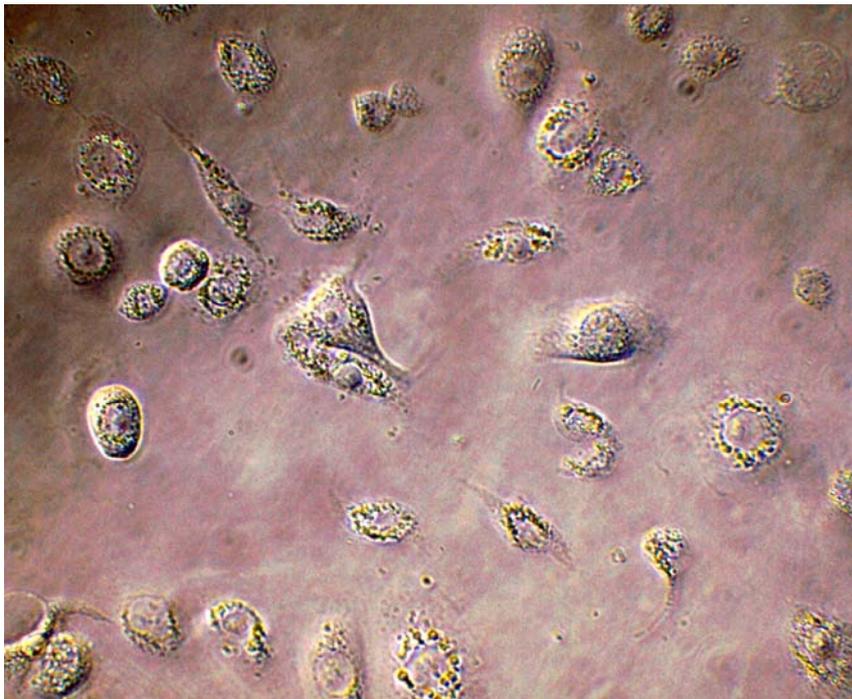
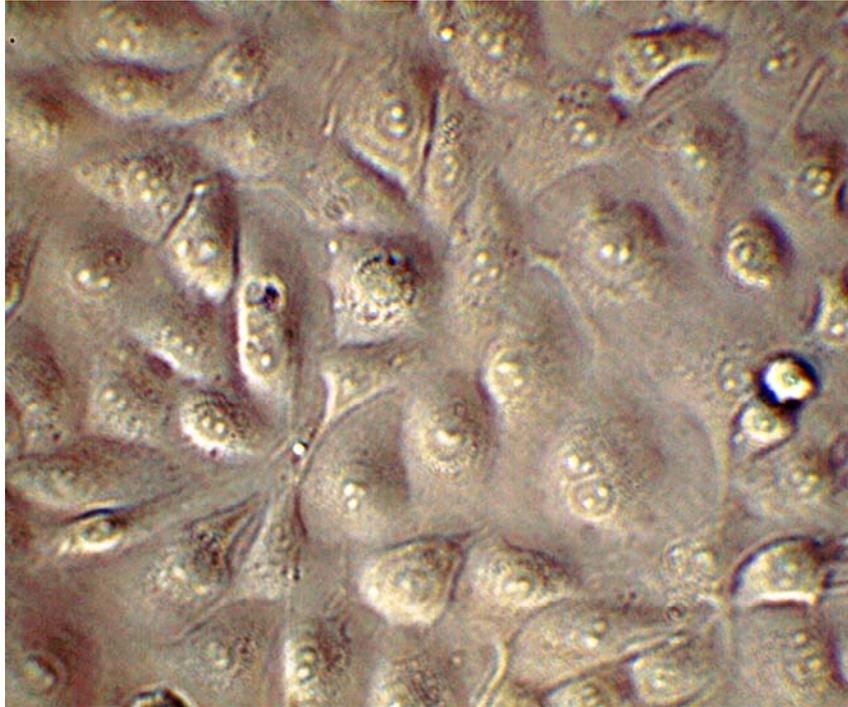


Figura 36 - Fotomicrografia das células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição do veneno da *Polybia paulista*. **A**: controle; **B**: 25 µg/mL, presença de citoplasma granuloso.

A



B



Figura 37 - Fotomicrografia das células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição do veneno da *Polybia paulista*. **A**: controle; **B**: 50 µg/mL, presença de agrupamento celular e citoplasma granuloso.

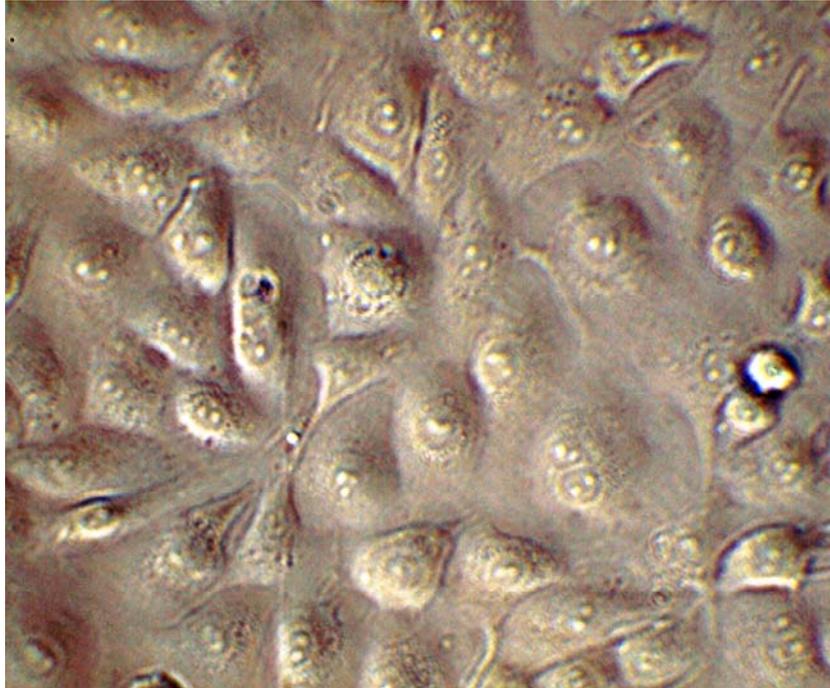
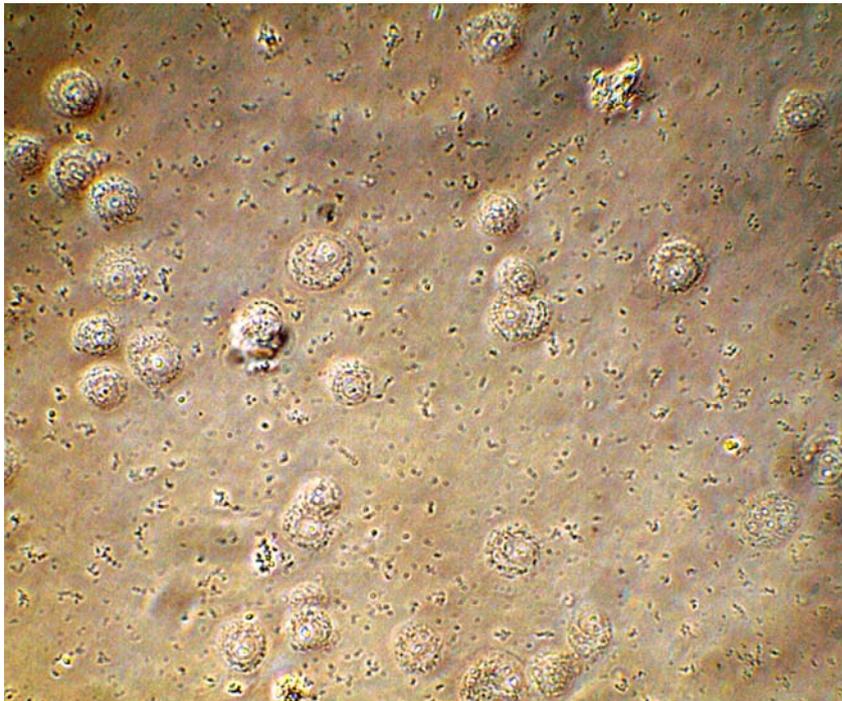
A**B**

Figura 38 - Fotomicrografia das células tubulares renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) após exposição do veneno da *Polybia paulista*. **A**: controle; **B**: 100 µg/mL, presença de agrupamento celular, citoplasma granuloso e lise celular.

5.4 Liberação de lactato desidrogenase (LDH)

Para investigar se o veneno foi capaz de alterar a integridade da membrana foram mensurados os níveis de lactato desidrogenase e foi observado um aumento significativo nas maiores concentrações estudadas, corroborando assim com as alterações morfológicas observadas em cultura de células (Figura 39).

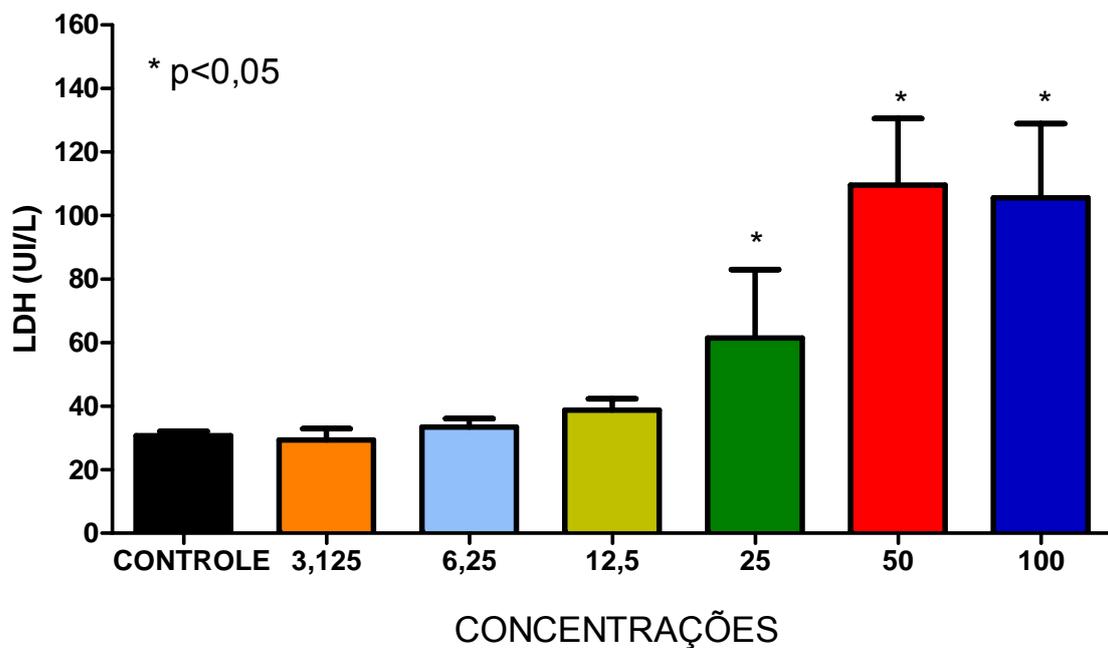


Figura 39 - Liberação de Lactato desidrogenase (LDH) após a adição de diferentes concentrações do veneno da *Polybia paulista* em células MDCK. Valores expressos em média \pm E.P.M. Para análise estatística foi usado a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

5.5 Leito vascular mesentérico

O ensaio com leito mesentérico foi realizado para investigar se o efeito vascular do veneno era direto ou indireto. Assim, foram testadas três concentrações (3, 10 e 100 μ g/mL). Na concentração de 3 μ g/mL não foi observada alterações significativas na pressão de perfusão do leito vascular mesentérico (tabela 7/figura 40).

Na concentração de 10 μ g/mL o veneno causou um aumento da pressão de perfusão, sendo este aumento correspondente a aproximadamente 35% da contração máxima (123,4mmHg) do sistema, obtida com a infusão de fenilefrina (5 μ M/mL), conforme tabela 8/figura 41. Na maior concentração estudada (100 μ g/mL), a pressão de perfusão também apresentou um aumento significativo de aproximadamente 48% da contração máxima (107,3mmHg) do sistema (tabela 9/figura 42). O efeito do veneno sobre o leito mesentérico foi concentração dependente ($VP_{p_{3\mu g/mL}} = 39,87 \pm 0,80$ vs $VP_{p_{100\mu g/mL}} = 52,15 \pm 2,37$ e $VP_{p_{10\mu g/mL}} = 43,10 \pm 1,77$ vs $VP_{p_{100\mu g/mL}} = 52,15 \pm 2,37$), conforme tabela 10/figura 43.

Tabela 7 - Pressão de perfusão do leito vascular mesentérico em ratos tratados com veneno de *Polybia paulista* (3µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL).

	Pressão (mmHg)
Pressão basal (controle)	39,76 ± 0,60
VPp (3µg/mL)	39,87 ± 0,80
Fenilefrina (5µg/mL)	121,90 ± 9,07*

Resultados expressos em média ± E.P.M.

* p<0,05 em relação a pressão basal;

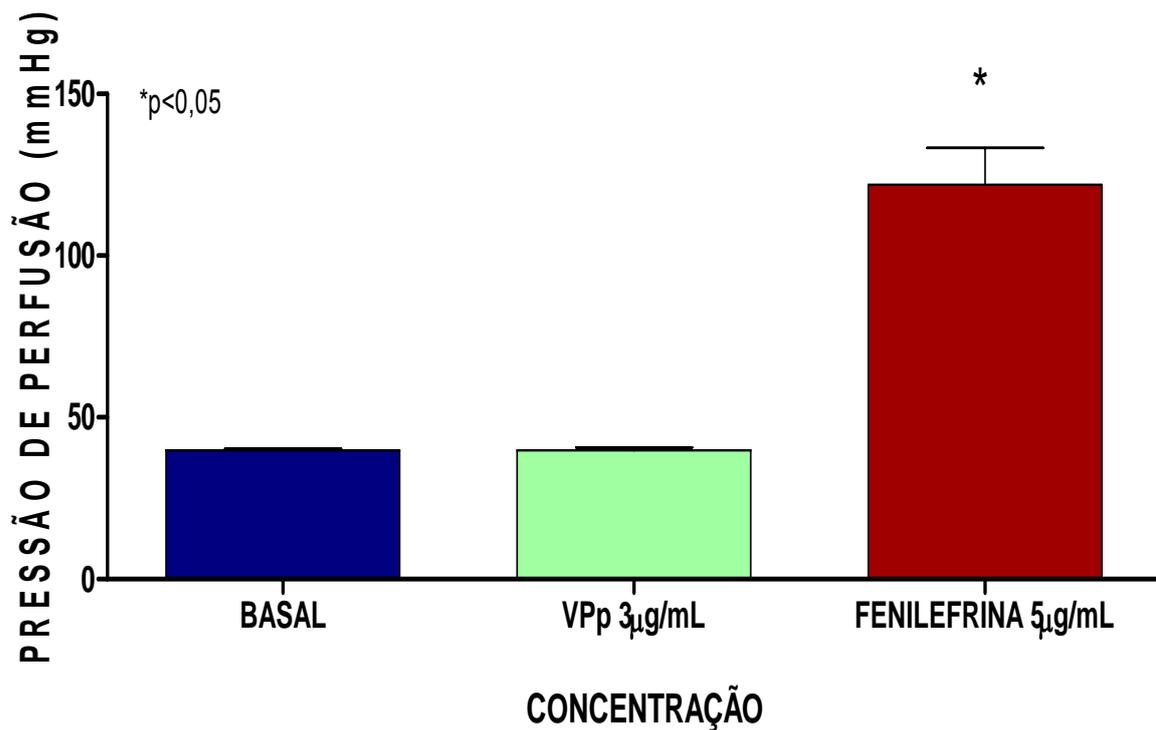


Figura 40 - Pressão de perfusão de leito mesentérico de ratos tratados com veneno de *Polybia paulista* (3µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. * p < 0,05.

Tabela 8 - Pressão de perfusão do leito vascular mesentérico em ratos tratados com veneno de *Polybia paulista* (10µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL).

	Pressão (mmHg)
Pressão basal (controle)	37,73 ± 0,40
VPp (10µg/mL)	43,10 ± 1,77*
Fenilefrina (5µg/mL)	123,40 ± 9,07*

Resultados expressos em média ± E.P.M.

* p<0,05 em relação à pressão basal;

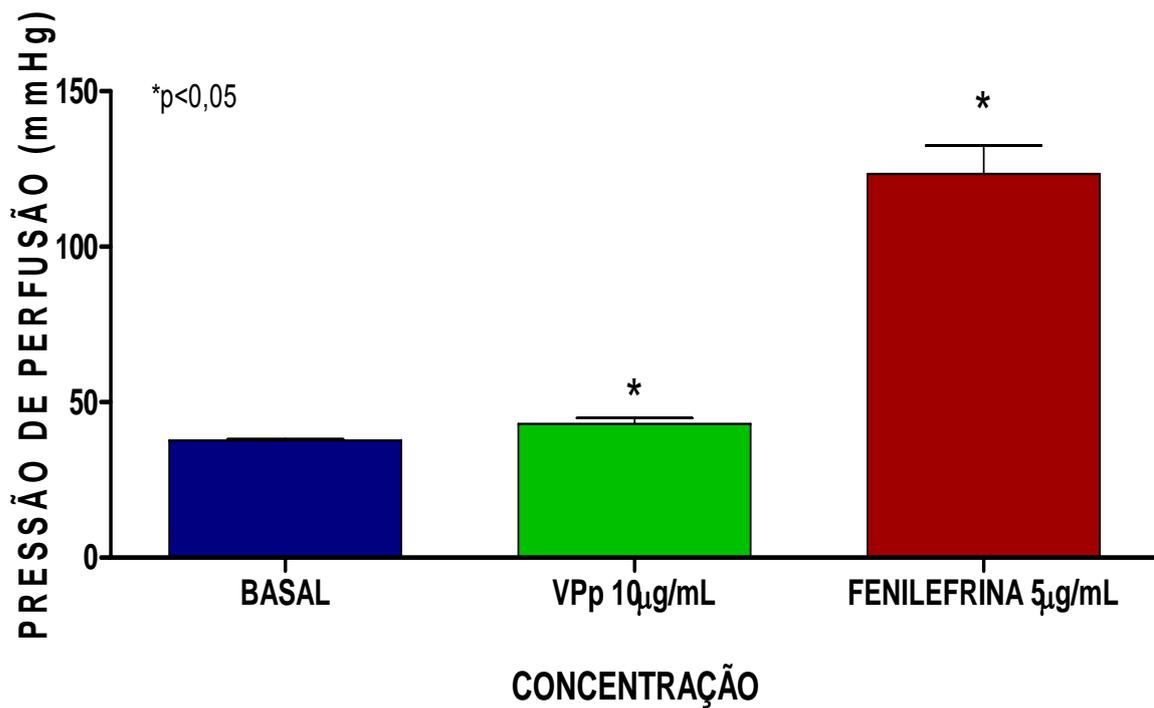


Figura 41 - Pressão de perfusão de leito mesentérico de ratos tratados com veneno de *Polybia paulista* (10µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. * p < 0,05.

Tabela 9 - Pressão de perfusão do leito vascular mesentérico em ratos tratados com veneno de *Polybia paulista* (100µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL).

	Pressão (mmHg)
Pressão basal (controle)	36,86 ± 0,69
VPp (100µg/mL)	52,15 ± 2,37*
Fenilefrina (5µg/mL)	107,3 ± 9,25*

Resultados expressos em média ± E.P.M.

* p<0,05 em relação à pressão basal;

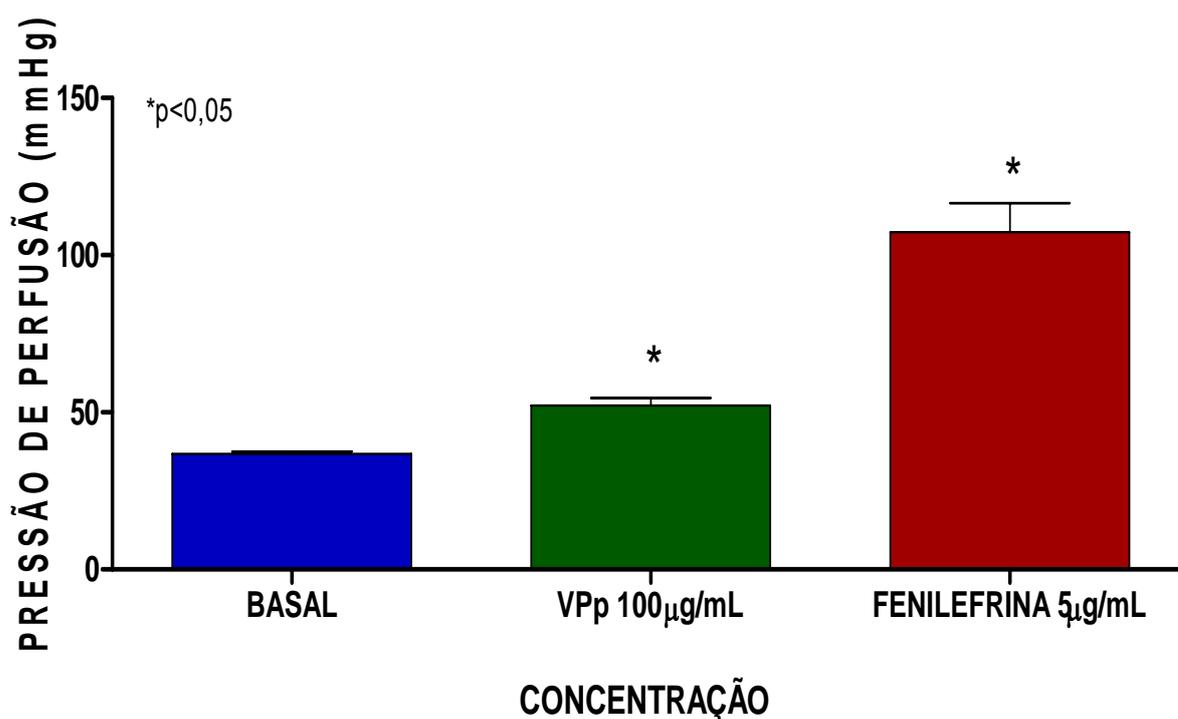


Figura 42 - Pressão de perfusão de leito mesentérico de ratos tratados com veneno de *Polybia paulista* (100µg/mL; n=4); Fenilefrina (5µg/mL). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. * p < 0,05.

Tabela 10 - Comparação entre as doses utilizadas do veneno de *Polybia paulista* (3,10 e 100 μ g/mL; n=4).

	Pressão (mmHg)
VPp (3 μ g/mL)	39,87 \pm 0,80
VPp (10 μ g/mL)	43,10 \pm 1,77
VPp (100 μ g/mL)	52,15 \pm 2,37 ^{a,b}

Resultados expressos em média \pm E.P.M.

* p<0,05 em relação à pressão basal;

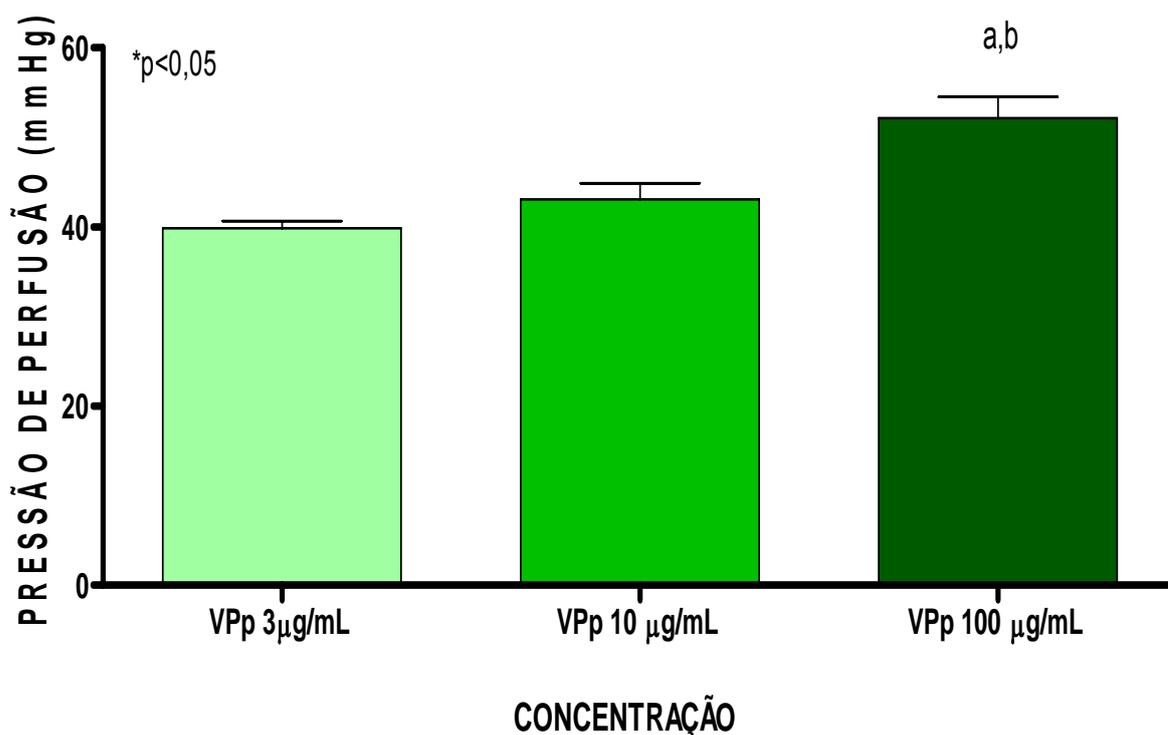


Figura 43 - Comparação entre as doses utilizadas do veneno de *Polybia paulista* (3,10 e 100 μ g/mL; n=4). a, representa p<0,05 em relação ao grupo perfundido com 3 μ g/mL; b, representa p<0,05 em relação ao grupo perfundido com 10 μ g/mL de veneno. Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. * p < 0,05.

5.6 Efeito do veneno em aorta isolada de rato

5.6.1 Efeito do veneno da *Polybia paulista* no tônus basal de aorta isolada na presença e na ausência de cálcio.

O veneno da vespa *Polybia paulista* (0,1 – 20 $\mu\text{g/ml}$), adicionado cumulativamente, produziu, de maneira concentração dependente, um aumento do tônus basal da aorta isolada com magnitude correspondente a $135,7 \pm 14,6\%$ ($n = 4$) em relação à contração de referência induzida por 60 mM de K^+ , como demonstrado na figura 44.

Para avaliar o envolvimento do cálcio extracelular no efeito do veneno a preparação foi mantida em meio sem cálcio e na presença de EGTA (1mM). O efeito vasoconstrictor do veneno de VPp foi significativamente reduzido nas concentrações 3, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 44).

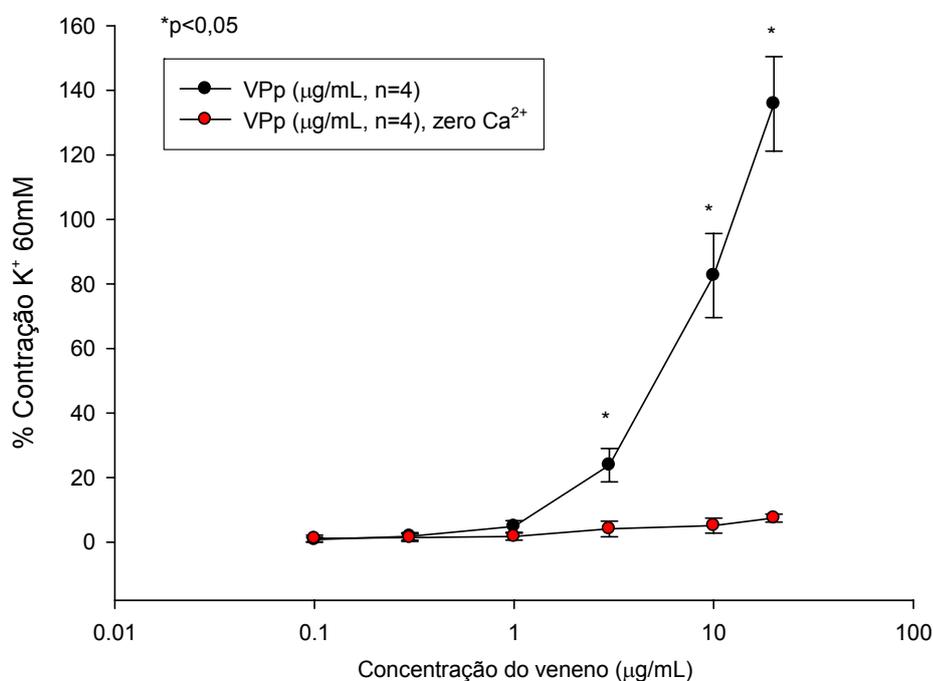


Figura 44 - Curva concentração – efeito do veneno da *Polybia paulista* em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca^{2+} 1 mM (\bullet , $n = 4$; 0,1 – 20 $\mu\text{g/mL}$) e na ausência de Ca^{2+} 1 mM (\bullet , $n = 4$; 0,1 – 20 $\mu\text{g/mL}$). Valores expressos em média \pm E.P.M., ANOVA, *Holm-Sidak* * $p < 0,05$.

5.6.2 Efeito do veneno da *Polybia paulista* na presença de Fentolamina

Para avaliar o envolvimento de receptores adrenérgicos no efeito contrátil do veneno foi adicionada fentolamina (5 μM) que reduziu significativamente o efeito produzido pelo veneno (figura 45).

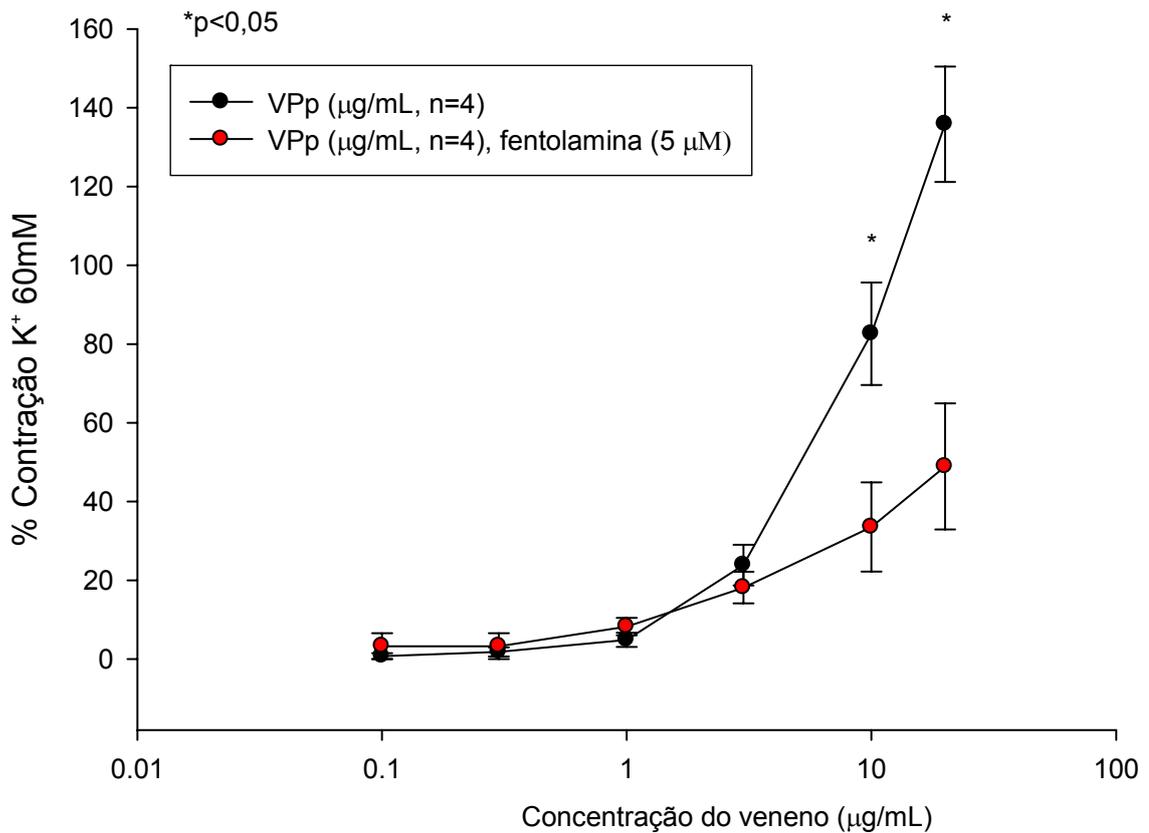


Figura 45 - Curva concentração - efeito do veneno da *Polybia paulista* em aorta com o endotélio intacto sem fentolamina (●, n = 4; 0,1 – 20 $\mu\text{g/mL}$) e na presença da fentolamina (●, n = 4; 0,1 – 20 $\mu\text{g/mL}$) Valores expressos em média \pm E.P.M., ANOVA, Holm-Sidak * $p < 0,05$.

5.6.3 Efeito do veneno da *Polybia paulista* na presença de Verapamil

A adição prévia de verapamil (10 μM), um bloqueador dos canais de cálcio, também reduziu significativamente a vasoconstrição induzida pelo veneno da *Polybia paulista* nas concentrações de 3, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, conforme demonstrado na figura 46.

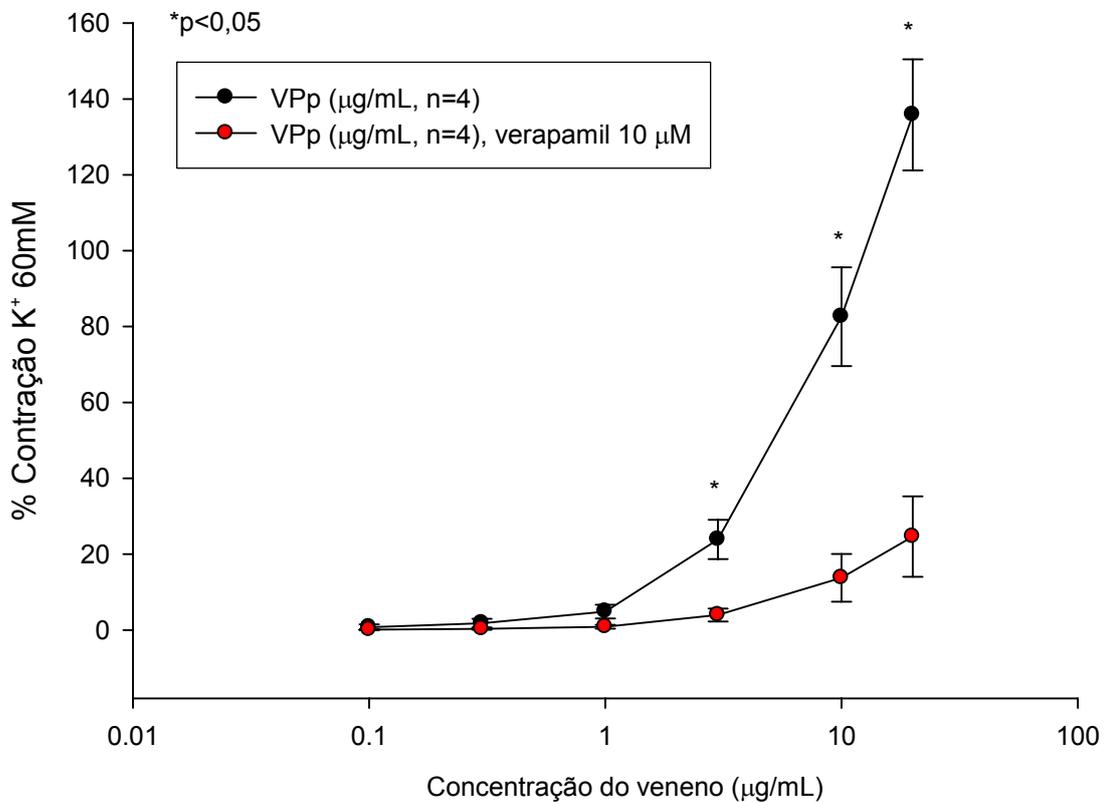


Figura 46 - Curva concentração – efeito do veneno de *Polybia paulista* em aorta com o endotélio intacto sem verapamil (●, n = 4; 0,1 – 20 $\mu\text{g/mL}$) e na presença do verapamil (●, n = 4; 0,1 – 20 $\mu\text{g/mL}$). Valores expressos em média \pm E.P.M., ANOVA, *Holm-Sidak* * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

A fauna brasileira de vespas sociais é constituída por diversas espécies, as quais possuem venenos pouco conhecidos bioquimicamente, farmacologicamente e imunologicamente. A espécie *Polybia Paulista* é uma vespa social muito endêmica no Sudeste do Brasil causando muitos acidentes, principalmente, com profissionais que entram em contato com seu ninho (OLIVEIRA; PALMA, 1998; SANTOS *et al.*, 2007). Além de ataques bastante agressivos, os acidentes com esses insetos apresentam certa severidade, com um número elevado de pacientes evoluindo com complicações graves ou óbito, incluindo a falência renal (FRANCA *et al.*, 1994).

Os efeitos do veneno da vespa *Polybia Paulista* na função renal, na contratilidade aórtica e em cultura de células renais não possuem relatos na literatura, embora esteja descrito a capacidade dos venenos vespídeos induzir neurotoxicidade (PAES-OLIVEIRA *et al.*, 1998; MORTARI, 2007), miotoxicidade (OLIVEIRA; SCHEIDT, 2005; ROCHA *et al.*, 2007) e lesões tubulares como a provável causa da falência renal aguda (BHATTA *et al.*, 2005; GRISOTTO *et al.*, 2006; DAS; MUKHERJEE, 2008; D'CRUZ *et al.*, 2008).

No presente estudo, com a infusão do veneno da *Polybia paulista* (3µg/mL) em rim isolado, foi observado um aumento da pressão de perfusão e da resistência vascular renal, acompanhados do aumento do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário. O efeito do veneno sobre a resistência renal foi provavelmente responsável por esse aumento na filtração glomerular e conseqüente aumento do fluxo urinário. Isso decorre pelo fato de que o processo de filtração renal depende de diversos fatores que interagem a nível glomerular, incluindo a pressão de perfusão, influenciada pela resistência vascular.

Fisiologicamente, a pressão arterial renal pode variar no intuito de manter o fluxo sanguíneo renal constante. O fluxo e o ritmo de filtração do glomérulo estão relacionados à pressão de perfusão renal, provavelmente, pela ativação de receptores adrenérgicos presentes nas arteríolas renais e em outros leitos vasculares. Assim, parece que o efeito vasoconstritor da arteríola eferente

reduz a saída de sangue do glomérulo levando ao aumento na resistência dos capilares glomerulares e conseqüentemente do filtrado glomerular (JOHNSON, 2000). Dessa forma, as alterações renais encontradas no presente estudo sugerem a participação de receptores adrenérgicos.

Há relatos de que o aumento da pressão de perfusão renal provocada após acidentes com *Hymenoptera* ocorre provavelmente pelo excesso de catecolaminas e outros compostos biologicamente ativos presentes no veneno (STRASSER *et al.*, 1992). Além disso, o acidente com vespas pode induzir a liberação endógena dessas substâncias por componentes da peçonha, como as fosfolipases A₂ (GRISOTTO *et al.*, 2006).

As alterações renais observadas nesse estudo corroboram com outros trabalhos descritos na literatura e que utilizam o mesmo modelo experimental, demonstrando efeitos similares com venenos de outra família e outros artrópodes.

Alves *et al.* (2005), demonstraram que o veneno total do escorpião *T. serrulatus*, é capaz de induzir diversas alterações na função renal, como aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular renal, bem como redução no percentual de transporte total de sódio, potássio e cloreto.

Em nosso estudo, foi observada uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio. Os percentuais de transporte tubular de potássio e cloreto apresentaram uma discreta redução, embora não foi significativa quando comparado ao grupo controle.

Estudos experimentais e clínicos sugerem que a patogênese das lesões renais induzidas por venenos da ordem *Hymenoptera* está relacionada com a ocorrência de rabdomiólise, vasoconstrição e toxicidade direta nas células tubulares renais (GRISOTTO *et al.*, 2006; DAS; MUKHERJEE, 2008).

A observação de danos diretos nos túbulos renais pode ser, dependendo de sua intensidade, irreversível (VIKRANT *et al.*, 2005). Assim, em nosso estudo, a redução significativa do percentual de transporte de sódio sugere que a peçonha da vespa *Polybia paulista* exerça efeitos sobre os túbulos renais.

A avaliação histopatológica de rins perfundidos com o veneno revelou depósito de material protéico nos túbulos e espaços urinários, possivelmente devido ao efeito tóxico do veneno sobre os glomérulos e túbulos renais. As células dos túbulos renais apresentaram regiões focais com núcleos picnóticos ou ausência de núcleos na maior concentração estudada. Assim, os efeitos vasculares encontrados, como o aumento pressórico renal, podem ter sido responsáveis pela passagem de proteínas dos capilares para o filtrado glomerular.

De um modo geral, o veneno da vespa *Polybia paulista* mostrou ser capaz de promover aumento na pressão de perfusão e resistência vascular renal levando, conseqüentemente, à elevação do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário. Essas alterações foram acompanhadas da perda da função de transporte tubular de sódio na maior concentração estudada, demonstrando, assim, uma injúria a nível tubular comprovada pela histologia.

Esses resultados corroboram com os achados de Alves *et al.* (2005), uma vez que em perfusão de rim isolado com o veneno de escorpião, foram observados picos pressóricos e depósito protéico nas estruturas renais similares ao encontrado pelo presente trabalho. Outro estudo, realizado com o veneno de abelhas (Hymenoptera, *Apidae*), também observou extravasamento de proteínas para os túbulos renais (GRISOTTO *et al.*, 2006).

Os achados descritos anteriormente indicam que o veneno da vespa *Polybia paulista* é capaz de induzir lesões diretas e/ou indiretas aos túbulos renais, podendo haver íntima relação dessas lesões com o desencadeamento de uma possível insuficiência renal aguda após acidentes com a vespa.

Zhang *et al.* (2001) descreveram a nefrite tubulointersticial como causa da insuficiência renal aguda após acidente com vespa. Vikrant *et al.* (2005) relataram três casos de pacientes com quadro de insuficiência renal aguda após ataques de vespas. Dois deles foram causados por necrose tubular aguda na presença de hemólise ou rhabdomiólise ou resultante de um efeito nefrotóxico direto. O terceiro foi devido à nefrite intersticial consequente à hipersensibilidade para com o veneno de vespa. Em outros estudos, a necrose tubular aguda esteve presente, fato que também corrobora com os achados renais do presente estudo (SITPRIJA *et al.*, 1972; SINGH *et al.*, 2005; D'CRUZ *et al.*, 2008; DAS; MUKHERJEE, 2008).

Em função das alterações histológicas e dos parâmetros funcionais encontradas nos rins perfundidos com veneno da vespa *Polybia paulista*, foi avaliada a citotoxicidade induzida pelo veneno em cultura de células renais, mais especificamente com células do epitélio tubular (MDCK).

Na maior concentração, o veneno causou dano às células renais observada pela redução da viabilidade celular e pela perda da integridade da membrana, visto em ensaios com MTT e liberação da lactato desidrogenase (LDH), respectivamente. Uma vez que a perda da integridade é acompanhada pelo aumento do LDH, foi sugerida que a morte celular é consequência da necrose e não da apoptose, confirmando o achado histológico realizado em rins perfundidos com veneno.

Han *et al.* (2002) observaram a citotoxicidade induzida pelo veneno de abelhas (*Hymenoptera, Apidae*) em cultura de células de túbulo proximal de coelhos, onde demonstraram a perda da viabilidade celular e o aumento da lactato desidrogenase. Grisotto *et al.* (2006) também demonstraram que após a adição do veneno de abelhas em túbulos proximais isolados de ratos foi observado um aumento significativo na liberação da lactato desidrogenase, da mesma forma, estudos de Das e Mukherjee (2008) acompanharam dois casos de pacientes que apresentaram uma elevação da lactato desidrogenase após acidente com vespas (*Hymenoptera, Vespidae*).

Essas alterações podem ser explicadas, provavelmente, pela presença de mastoparanos na composição do veneno de vespídeos o qual está envolvido na morte celular por necrose e apoptose (PERIANIN; SNYDERMAN, 1989) e ainda contribui para o extravasamento de proteínas, como observado no estudo histológico resultante de uma desestabilização da membrana basal glomerular (ROCHA *et al.*, 2007).

Em função das alterações renais com o veneno da vespa *Polybia paulista*, experimentos foram realizados com leito vascular mesentérico isolado e foi observada a participação vascular no aumento da pressão e da resistência vascular. Também foi observado o efeito dose dependente do veneno, uma vez que baixas concentrações (3µg/mL) não apresentaram alterações significativas, concentrações intermediárias (10µg/mL) demonstraram atividade constritora, e altas concentração (100µg/mL) demonstraram efeito vasoconstritor ainda maior, provavelmente pela presença de aminas biologicamente ativas no veneno da *Polybia paulista*.

A fim de investigar a possível ação vasoconstritora, do veneno da vespa *Polybia paulista*, foram realizados experimentos em aorta isolada. Nossos ensaios revelaram que o veneno aumentou a contratilidade dos anéis de aorta mantidos sob tensão basal confirmando assim o efeito vasoconstritor do veneno.

Vários mecanismos estão envolvidos na contração do tecido liso vascular. As células musculares lisas podem contrair de uma forma direta, através de seus receptores específicos para neurotransmissores, e de forma indireta, através da liberação de substâncias derivadas do endotélio (COELHO *et al.*, 2002). Isso decorre do influxo de cálcio através da membrana e da liberação dos estoques intracelulares, que tem papel fundamental na contração vascular (JACKSON, 2008).

Sabe-se que a contração do músculo liso ocorre principalmente pelo influxo de íon de cálcio para a célula muscular e que, quando a concentração desse íon no líquido extracelular é reduzida, a contração do músculo liso é praticamente abolida (CONSTANZO, 2004). No presente estudo, em meio desprovido de cálcio a resposta contrátil da vespa *Polybia paulista* foi inibida. Da mesma forma, com o uso do

verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio operado por voltagem o efeito inibitório permanece, confirmando assim a participação dos canais de cálcio operados por voltagem na contração induzida pelo veneno.

Neste trabalho, o uso da fentolamina, um bloqueador dos receptores alfa adrenérgicos, demonstrou significativamente redução no efeito contrátil do veneno em anel de aorta, sugerindo a participação desses receptores e corroborando assim com os achados encontrados em rim isolado.

7 CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que o veneno de *Polybia paulista* induziu alterações nos parâmetros renais, aumentando a resistência vascular, a pressão de perfusão, o ritmo de filtração glomerular e o fluxo urinário. O veneno ocasionou uma redução significativa do percentual de transporte de sódio.

Em ensaios com cultura de células do túbulo renal, o veneno da vespa *Polybia paulista* causa morte celular em células tubulares por necrose em elevadas concentrações, uma vez que houve liberação de lactato desidrogenase.

Os ensaios com leito mesentérico sugerem a ação vascular direta do veneno no efeito vasoconstritor.

Em aorta isolada de rato, o veneno da *Polybia paulista* causou um efeito contrátil que envolve o influxo de cálcio através de canais operados por voltagem, provavelmente mediado pela ativação de receptores α -1 adrenérgicos.

Por fim, o trabalho aponta perspectivas no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos observados, bem como para direcionar o fracionamento do veneno, na busca dos componentes que tenham atividade vasoconstritora que possam ser utilizados como ferramentas farmacológicas e ou terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABE, T.; SUGITA, M.; FUJIKURA, T.; HIYOSHI, J.; AKASU, M. Giant hornet (*Vespa mandarina*) venomous phospholipases. The purification, characterization and inhibitory properties by bisclouaine alkaloids. **Toxicon**, v.38, p.1803–1816, 2000.
- ALLALOUF, D.; BER, A.; ISHAY, J. Hyaluronidase activity of venom sacs of a number of vespidae (hymenoptera). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.43, p.119-123, 1972.
- ALVES, R.S.; NASCIMENTO, N.R.F.; BARBOSA, P.S.F.; KERNTOPF, C.M.; LESSA, R.D.; SOUSA, C.M.; MARTINS, R.D.; SOUSA, D.F.; QUEIROZ, M.G.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v.46, p.271-276, 2005.
- ANDENA, R.S. Análise filogenética de alguns gêneros de vespas sociais neotropicais (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). **Tese (Doutorado)**. Centro de Ciências, 2007.
- ANTONICELLI, L., BILO, M.B., BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. Curr. Opin. **Allergy Clin. Immunol.** v.2, p.341–346, 2002.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M. **Fisiologia**. 5ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2004.
- BOCHNER, R. & STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n.3, 2002.
- BHATTA, N.; SINGH, R.; SHARMA, S.; SINHA, A.; RAJA, A. Acute renal failure following multiple wasp stings. **Pediatr Nephrol**, v.20, p.1809–1810, 2005.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. – Brasília, 2001.
- BUZIN, M. P. **Atividades enzimáticas e biológicas do extrato de sacos de veneno da vespa social *Polistes lanio lanio***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

CARPENTER, J. M.; MARQUES, O. M. **Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta, Hymenoptera, Vespoidea, Vespidae)**. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2001. (Publicações digitais, v.2,).

CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N.; MALASPRINA, G. Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas. *In*: BARRAVIERA, B. (Org.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. p.14-18.

COELHO, T. H.; OLIVEIRA, S. M.; MOREIRA, A. L. **Regulação do tono vascular**. Porto: Serviço de Fisiologia, Faculdade de medicina da Universidade do Porto, 2002.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DE SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; MENDES, M. A.; PALMA, M.S. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Rapid Commun. Mass. Spectrom*, v.18, p.1095–1102, 2004.

de SOUZA, B. M.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D.; MARQUES, M. R.; CESAR, L. M.; ALMEIDA, R. N.; PAGNOCCA, F. C.; KONNO, K.; PALMA, M. S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, n.11, p. 2157-2164, 2005.

DAS, R. N.; MUKHERJEE, K. Asian wasp envenomation and acute renal failure: a report of two cases. **McGill J. Med.**, v.11, p. 25-28, 2008.

D'CRUZ, S.; CHAUHAN, S., SINGH, R.; SACHDEV, A.; LEHL, S. Wasp sting associated with type renal tubular acidosis. **Nephrol. Dial Transplant**, v. 0, p. 1-2, 2008.

EDERY, H.; ISHAY, J.; GITTER, S.; JOSHUA, H. **Venons of Vespidae. Arthropod venoms**. New York: Springer-Verlag, 1978. p. 691-771.

ESHER, S. H. G.; CASTRO, A. P. B. M.; CROCE, J.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. F. M.; KALLI, J. E.; CASTRO, F. F. M. Study of laboratorial methods for Hymenoptera allergy diagnosis: A critical analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.** Saint Louis, v.107, n.2, p.375, 2001.

FONTELES, M. C. **Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado: papel dos lipídeos endógenos no transporte de sódio e função renal**. Dissertação (mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, 1980.

FONTELES, M.C.; COHEN, J.J.; BLACK, A.J.; WERTHEIM, S.J. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** v. 244, p. 235-246, 1983.

FRANCA, F. O.; BENVENUTI, L. A.; FAN, H. W.; DOS SANTOS, D. R.; HAIN, J. H.; MARTINS, F. R.; CARDOSO, J. L.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D.A. Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees—*Apis mellifera scutellata*). **Q. J. Med.**, v. 87, p. 269–282, 1994.

FREITAS, G. C. C.; OLIVEIRA, A. E.; FARIAS, J. E. B.; VASCONCELOS, S. D. Acidentes por aranhas, insetos e centopéias registrados no centro de assistência toxicológica de Pernambuco (1993 a 2003). **Rev. Patol. Trop.**, v.35, p.148-156, 2006.

GARCIA, F. R. M. **Zoologia agrícola: manejo ecológico de pragas**. Porto Alegre: Rígel, 1999.

GOODMAN, A.; GOODMAN, L.; GILMAN, A. **The pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw Hill, 1996.

GRIESBACKER, T.; ALTHUBER, P.; ZENZ, M.; RAINER, L.; GRIENGL, S.; LEMBECK, F. *Vespa vulgaris* venom: role of kinins and of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v.351, p.95-104, 1998.

GRISOTTO, L. S. D.; MENDES, G. M.; CASTRO, A. C.; BAPTISTA, M. A. S. F.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v.48, p.44–54, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 10th ed. New York: W.B. Saunders, 2000.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**, v. 117, p. 314-322, 1972.

HAN, H.J.; PARK, S.H.; LEE, J.H.; YOON, B.C.; PARK, K.M.; MAR, W.C., LEE, H.J.; KANG, S.K. Involvement of oxidative stress in bee venom-induced inhibition of Na⁺/glucose cotransporter in renal proximal tubule cells. **Pharmacol. Physiol.**, v. 29, p. 564–568, 2002.

HANSON, R. W. A.; BALLARD, F.S. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid Res.**, v. 9, n. 5, p. 667-668, 1968.

HIGASHIJIMA, T.; ROSS, E. M. Mapping of the mastoparan binding site on G proteins. Cross-linking of [125I-Tyr³, Cys¹¹] mastoparan to go. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 19, p. 12655–12661, 1991.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; FUJINO, M.; KITADA, C. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). **Chem. Pharm. Bull.**, v. 27, p.1945–1946, 1979.

HIRATA, Y.; NAKAHATA, N.; OHIZUMI, Y. Identification of a 97-kDa mastoparan-binding protein involving in Ca²⁺ release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Mol. Pharmacol.**, v.57, p.1235–1242, 2000.

HIRATA, Y.; ATSUMI, M.; OHIZUMI, Y.; NAKAHATA, N. Mastoparan binds to glycogen phosphorylase to regulate sarcoplasmic reticular Ca²⁺ release in skeletal muscle. **Biochem. J.**, v. 371, p.81–88, 2003.

HOFFMAN, D. R. Hymenoptera venoms allergens. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v.30, n. 2, p.109-128, 2006.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173, 2000.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de Fisiologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

JUCÁ, D. M. **Propriedades farmacológicas dos monoterpenos α - e β -pineno no músculo liso gastrointestinal de ratos: efeito miorelaxante e pró-cinético**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potencial of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.2, n. 10, p.790-802, 2003.

LIU, S.; WANG, F.; TANG, L.; GUI, W.; CAO, P.; LIU, X.; POON, A. P.; SHAW, P.; JIANG, T. Crystal structure of mastoparan from *Polistes jadwagae* at 1.2 Å resolution. **J. Struct. Biol.**, v.160, n. 1, p.28-34, 2007.

LIMA, M. A.P.; de LIMA, J. R.; PREZOTO, F. Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sociais (HYMENOPTERA, VESPIDAE) no Campus da UFJF, Juiz de Fora, MG. **Rev. Bras. Zool.**, v. 2 n.1, 2000.

LORENZI, C. C. B. **Estudo estrutural de mastoparanos isolado de vespas solitárias**. 2002. 115 p. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São Jose do Rio Preto, 2002.

MANICA, J. **Anestesiologia: princípios e técnicas**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978.

MEBS, D. **Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists, physicians and pharmacists**. [S.I.]: CRC Press, 2002.

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

MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effects of *Bothrops jararaca* venom on rat kidneys after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 85, p. 198-200, 1999.

MORTARI, M. R. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 97, n. 5, p. 289-295, 2005.

MORTARI, M.R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; Dos SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 114, p.171-183, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1/2, p. 55-63, 1983.

NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, T.; FUKUDA, K.; SUKAMOTO, T. Wasp Kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Peptides**, v.6, p.425-430, 1985.

OLIVEIRA, M. R. P. **Efeitos do veneno bruto de *Polybia (Mirapetra) paulista* (LEHRING, 1896) em camundongos: estudos bioquímicos, farmacológicos e**

morfológicos. 2000. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

OLIVEIRA, M. R.; PALMA, M. S. Polybitoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). **Toxicon**, v. 36, p.189-199, 1998.

OLIVEIRA, M. R. P.; SCHEIDT, A. C. Patogênese da mionecrose em preparações de diafragma de camundongo induzida pelo veneno bruto da vespa social *Polybia paulista*. **Ci. Biol. Saúde**, v.11, n.1, p.47-54, 2005.

OWEN, M. D.; BRIDGES, A. R. Catecholamines in honeybee (*Apis mellifera* L.) and various vespids (Hymenoptera) venoms. **Toxicon**, v. 20, p.1075-1084, 1982.

PAES-OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HOFLING, M. A. Postsynaptic effects of *Polybia paulista* wasp venom on skeletal muscle. *In*: SYMPOSIUM OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF TOXINOLOGY, 5th, 1998, Angra dos Reis. **Abstract...** Angra dos Reis, RJ: 1998. p. 216.

PALMA, M. S. Insect Venom Peptides. *In*: KASTIN, A. (Ed.). **Handbook of Biologically Active Peptides**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 389-396.

PALMA, M. S.; YAMAME, T.; CAMARGO, A. C. M. **Biodiversidade**: preservação e bioprospeção. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagem/biodiversidade/bio13.htm>>. Acesso em: 06 Jun.2009.

PEDRO, E. **Alergia e Insectos**. Disponível em: <<http://www.medicoassistente.com/modules/smartsection/item.php?itemid=15>>. Acesso em: 6 jun. 2009.

PERIANIN, A.; SNYDERMAN, R. Mastoparan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol trisphosphates in human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v.143, p.1669–1673, 1989.

PIEK, T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. **Toxicon**, v. 29, p.139-149, 1991.

PRACIANO, T. P. **Estudo dos efeitos renais e vasculares do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis* e fração isolada**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, 2009.

PREZOTO, P.; CORTES, S. A. O.; MELO, A. C. Vespas: de vilãs a parceiras. **Ciência Hoje**, v. 43, p. 253, 2008.

RIBEIRO, S. P.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D.; SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; AZEVEDO, W. F.; PALMA, M. S. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 25, p. 2069–2078, 2004.

ROCHA, T.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S., CRUZ-HOFLING, M.A. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, *Epiponini*) wasp venom in mice skeletal muscle. **Toxicon**, v. 50, p. 589-599, 2007.

RICHARD, O. W. **The social wasp of Americas**. London: British Museum of natural History, 1978.

ROSEMBERG, P.; ISHAY, J.; GITTER, S. Phospholipase A and B of the Oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom and venom apparatus. **Toxicon**, v.15, p.141-156, 1977.

SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; SOUZA, B. M.; ARCURI, H. A.; NETO, C. N.; CASTRO, F.M. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**. v.50, p. 923-937, 2007.

SILVA, E. C. **Caracterização de toxinas presentes em peçonha de vespas**. 2003. 201 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SITPRIJA, V.; BOONPUCKNAVIG, V. Renal failure and myonecrosis following wasp sting. **Lancet**, v. 1, p. 749-750, 1972.

SCHMIDT, J.O. Biochemistry of insect venoms. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 27, p.339-368, 1982.

SINGH, L. R.; SINGH, Y. T.; SINGH, N. S. K.; SHARMA, L. R. Acute renal failure in a child following multiple wasp stings. **Indian J. Nephrol.**, v.15, p.95-97, 2005.

SPRADBERY, J. P. **Wasps – An Account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps**. London: [s.n], 1973.

STEEN, C. J.; JANNIGER, C. K.; SCHUTZER, S. E.; SHUWARTZ, R. A. Insect sting reactions to bees, wasps and ants. **Int. J. Dermatol.**, v. 44, p.91-94, 2005.

STRASSER, R. H.; VAL, R.; MARQUETANT, R. Molecular review: molecular biology of adrenergic receptors. **J. Hypertens.**, v.10, p.501–506, 1992.

TAVARES, B. Alergia a veneno de himenópteros: Novos métodos de diagnóstico. **Acta Med. Port.**, v. 18, p. 445-452, 2005.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Laboratório de Vespas Sociais. **Vespas Sociais–Tribo *Epiponini***. Disponível em: <<http://www.ibilce.unesp.br/departamentos/dzb/labvespas/triboepiponini.htm>> Acesso em: 7 jul. 2009.

VIKRANT, S.; PANDEY, D.; MACHHAN, P.; GUPTA, D.; KAUSHAL, S.S.; GROVER, N. Wasp envenomation-induced acute renal failure: A report of three cases (Case Report). **Nephrology**, v.10, p. 548–552, 2005.

WILSON, E. O. The insects and man. *In*: SAIDEMBERG, N. B. B. **Efeito das Interações Peptídeo-Peptídeo e Peptídeo-Membrana nas Atividades Funcionais de Toxinas Peptídicas do Veneno da Vespa Social *Agelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera, Vespidae)**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2007.

ZHANG, R.; MELEG-SMITH, S.; BATUMAN, V. Acute tubulointerstitial nephritis after wasp stings. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 38, n. 6, p. E33, 2001.