

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ELISANDRA AURÉLIA DUARTE JOAQUIM

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE NO
EXTRATO DE GLÂNDULA DO VENENO DE *POLYBIA PAULISTA***

PONTA GROSSA
2019

ELISANDRA AURÉLIA DUARTE JOAQUIM

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE NO
EXTRATO DE GLÂNDULA DO VENENO DE *POLYBIA PAULISTA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira.
Coorientadora: Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa

PONTA GROSSA
2019

J62 Joaquim, Elisandra Aurélia Duarte
Identificação e caracterização de inibidor de protease no extrato de glândula de veneno de *Polybia paulista*. / Elisandra Aurélia Duarte Joaquim. Ponta Grossa, 2019.
51 f.

Dissertação (Ciências biomédicas - Área de Concentração: Bioquímica dos processos celulares), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira.
Coorientadora: Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa.

1. Inibidor de cisteíno protease. 2. Inibidor de serino protease. 3. *Polybia paulista*. 4. Inibidores. 5. Glândula de veneno. I. Silveira, Rafael Bertoni da. II. Costa, Michele Dietrich Moura. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Bioquímica dos processos celulares. IV.T.

CDD: 574.192



**Universidade Estadual
de Ponta Grossa**



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA __/2019, DA MESTRANDA ELISANDRA AURÉLIA DUARTE REALIZADO NO DIA 19 DE DEZEMBRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezoito dias de dezembro de 2019, às 10h00min no Auditório de Pós Graduação em Biologia Evolutiva, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professora Dra. Michele Dietrich Moura Costa** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda Elisandra Aurélia Duarte na linha de pesquisa; **Bioquímica dos processos celulares**, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professora Dra Iriane Eger (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Marianna Boia Ferreira (Universidade Positivo-PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e o candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“Identificação e caracterização de inibidor de protease no extrato de glândula do veneno de *Polybia paulista*.”** Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADA considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Michele Dietrich Moura Costa
Michele Dietrich Moura Costa- (DEBIOGEM - UEPG)- Presidente

Iriane Eger
Iriane Eger 2- (DEBIO - UEPG) – Titular

Marianna Boia
Marianna Boia Ferreira 3- (Universidade Positivo-PR) – Titular

Ponta Grossa, 19 de dezembro 2019.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho à minha família,
E às 17.332 vespas que contribuíram involuntariamente
para a realização desse trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, mistério que desperta a nossa fé em querer sempre buscar explicações fora de nós mesmo: gratidão pela vida.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade de realização da Pós-Graduação.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, muito obrigada, pelas orientações e apoio.

Ao Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira, pela contribuição de seus conhecimentos, delineamento dos experimentos, orientações e sugestões desta dissertação.

A Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa, pelas orientações, colaboração de informações, empréstimo de reagentes e correções que auxiliaram na concretização deste estudo.

Aos professores da banca de qualificação e defesa pelas validas considerações que só valorizaram cada vez mais o trabalho.

A Profa. Dra. Helena Nader e Prof. Dr. Marcelo Lima pela oportunidade de aprendizado na Universidade Federal de São Paulo, abrindo as portas do laboratório para a realização dos experimentos de cromatografia e contribuições com insumos utilizados nessa pesquisa. Agradeço também a Cisa e Gustavo por auxiliaram nos experimentos.

Ao meu amigo Luiz Fernando Patekoski Braga, meu muito obrigada, sinto muita gratidão por você, pelo apoio, incentivo e dedicação no compartilhamento das técnicas utilizadas para a elaboração deste trabalho.

Agradeço a Jana do laboratório de microbiologia, que sempre estava pronta a me auxiliar não medindo esforços.

Aos meus amigos de mestrado Rubens pelo tutorial do programa ImageJ, Camila, Cleyson e Alais sempre me apoiando em todos os momentos, todos os momentos mesmo.

As zeladoras sempre cumprimentando e mantendo a ordem da universidade, aos meninos dos recursos hídricos, nunca se recusaram a me servir, agradeço de coração. Aos guardas da vigilância que cuidavam quando eu ficava no laboratório até altas horas.

Agradeço muitíssimo aos professores Jose Rosa e Maria Albertina, mesmo com as dificuldades que encontrei no começo do mestrado sempre continuaram torcendo para que eu alcançasse o objetivo, as críticas foram bem-vindas, nunca vou me esquecer do professor José Rosa parado na porta do laboratório perguntando como estava e me dando conselhos. Sim vocês foram muito importantes para o meu crescimento.

Ao professor Airton por colocar meu nome em pauta de reunião, me oferecendo nova oportunidade para a conclusão deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

RESUMO

O veneno da vespa social *Polybia paulista*, geralmente formado de uma complexa mistura de componentes, mostra ser uma grande área de estudo para descoberta de novas biomoléculas. Os inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos amplamente distribuídos na natureza; são moléculas que têm a capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas formando complexos estáveis com proteases-alvo. Investigar as propriedades biológicas e farmacológicas de inibidores de proteases é fundamental para compreender seus mecanismos em processos patofisiológicos, além da potencial utilização para fins econômicos e terapêuticos. O objetivo do trabalho foi a identificação e caracterização de inibidores de protease no extrato de glândula do veneno da vespa. Para isso, primeiro foi extraído as proteínas do veneno por dissecação manual e armazenados em PBS. Após foi identificado a presença do inibidor de protease por zimografia reversa copolimerizada com gelatina, incubado com tripsina. Na sequência, houve a caracterização do inibidor de protease por zimografia reversa, utilizando diferentes substrato em conjunto com a incubação de diferentes enzimas proteolíticas: tripsina, papaína, α -quimotripsina, proteinase k e pepsina. Após esse processo, foi realizado o enriquecimento dos componentes proteicos do extrato do veneno de *Polybia paulista* através de cromatografia por exclusão molecular utilizando coluna Yara Phenomenex Sec. 2000. Com isso foi possível rastrear as eluições para encontrar o inibidor de protease das frações cromatográficas, utilizando-se SDS-PAGE gradiente (20 a 5%) corado com coloração de prata monocromática e zimografia reversa em diferentes tempos de incubação corados com *Comassie blue* R-250. Identificou-se a presença de inibidor de protease sobre a tripsina nos dois ninhos utilizados para esse trabalho, ambos com migração eletroforética próximo a 150kDa. Foi investigada a possível interação do agente redutor β -mercaptoetanol com a temperatura, observou-se perda de atividade inibitória a 100°C e a não-interação do agente redutor com o inibidor presente no extrato. Na caracterização com as enzimas e substratos, visualizou-se com o substrato gelatina um inibidor com 150 kDa que inibiu as enzimas tripsina, α -quimotripsina e proteinase K, todas pertencentes a classe das serino-proteases. No substrato caseína foi encontrado um inibidor com 100 kDa e com os substratos ovoalbumina e BSA um inibidor de 60kDa. Com a enzima papaína da classe dos inibidores de cisteíno-protease apresentou a mesma migração eletroforética que foi encontrada em todas as outras enzimas em seus respectivos substratos. Foi possível avaliar o pH ótimo de atividade inibitória com a enzima pepsina que requer um pH 2,0 para a sua atividade, demonstrando que os inibidores são influenciados pelo pH. A cromatografia por exclusão molecular permitiu uma separação das moléculas, mas não o isolamento do inibidor. Considerando os resultados obtidos, os inibidores de protease presentes no extrato de glândula de veneno de *P. paulista* colaboram com outros pesquisadores que mostram a presença de inibidores de serino-cisteíno protease no veneno, são ainda poucos compreendidos em suas funções que precisariam ser respondidas e elucidadas.

Palavras-chaves: *Polybia paulista*, glândula de veneno, inibidor de serino-protease, inibidor de cisteíno-protease.

ABSTRACT

The poison of the social wasp *Polybia paulista*, usually formed of a complex mixture of components, proves to be a great area of study for the discovery of new biomolecules. Protease inhibitors are proteins or peptides widely distributed in nature; are molecules that have the ability to inhibit the action of proteolytic enzymes forming stable complexes with target proteases. Investigating the biological and pharmacological properties of protease inhibitors is essential to understand their mechanisms in pathophysiological processes, in addition to their potential use for economic and therapeutic purposes. The objective of the work was to identification and characterization of protease inhibitors in wasp venom gland extract. For this, the proteins from the poison were first extracted by manual dissection and stored in PBS. Afterwards, the presence of the protease inhibitor was identified by reverse zymography copolymerized with gelatin, incubated with trypsin. Then, the protease inhibitor was characterized by reverse zymography, using different substrates in conjunction with the incubation of different proteolytic enzymes: trypsin, papain, α -chymotrypsin, proteinase k and pepsin. After this process, the protein components of the poison extract of *Polybia paulista* were enriched by means of molecular exclusion chromatography using the Yara Phenomenex Sec. 2000 column. Thus, it was possible to trace the elutions to find the protease inhibitor of the chromatographic fractions, using SDS-PAGE gradient (20 to 5%) stained with monochromatic silver staining and reverse zymography at different incubation times stained with Comassie blue R -250. The presence of protease inhibitor on trypsin was identified in the two nests used for this work, both with electrophoretic migration close to 150kDa. The possible interaction of the reducing agent β -mercaptoethanol with temperature was investigated, loss of inhibitory activity was observed at 100 ° C. and the non-interaction of the reducing agent with the inhibitor present in the extract. In the characterization with the enzymes and substrates, an inhibitor with 150 kDa was visualized with the gelatin substrate that inhibited the enzymes trypsin, α -chymotrypsin and proteinase K, all belonging to the class of serine proteases. In the casein substrate an inhibitor with 100 kDa was found and with the substrates ovalbumin and BSA an inhibitor of 60kDa. With the enzyme papain of the class of cysteine protease inhibitors it showed the same electrophoretic migration that was found in all other enzymes in their respective substrates. It was possible to evaluate the optimal pH of inhibitory activity with the enzyme pepsin that requires a pH 2.0 for its activity, showing that the inhibitors are influenced by pH. Molecular exclusion chromatography allowed the molecules to separate. Considering the results obtained, the protease inhibitors present in the extract of the venom gland of *P. paulista* collaborate with other researchers who show the presence of inhibitors of serine-cysteine protease in the venom, there are still few understood in their functions that would need to be answered and elucidated.

Keywords: *Polybia paulista*, venom gland, serine protease inhibitor, cysteine protease inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Polybia paulista</i>	13
Figura 2: Inibidor de tripsina pancreática bovina (bovino pâncreas)	20
Figura 3: Inibidor de tripsina do ovo de galinha (Type II-O).....	21
Figura 4: Local de fixação do ninho e procedimento da coleta. A - Procedimento de coleta do ninho 1. B - Local de fixação do ninho	23
Figura 5: Análise da presença do inibidor de protease presente em glândula de veneno de <i>P. paulista</i>	32
Figura 6: Avaliação do efeito das condições redutoras (β -mercaptoenol) e do aquecimento sobre a atividade proteolítica do extrato de glândula de veneno de <i>P. paulista</i>	33
Figura 7: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de <i>P. polybia</i> sobre a tripsina .	34
Figura 8: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de <i>P. polybia</i> sobre a papaína.	35
Figura 9: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de <i>P. polybia</i> sobre a α -quimotripsina.....	36
Figura 10: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de <i>P. polybia</i> sobre a pepsina	37
Figura 11: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de <i>P. polybia</i> sobre a proteinase K.....	38
Figura 12: Cromatografia por exclusão molecular	39
Figura 13: Atividade inibitória das frações purificadas.....	40

LISTA DE SIGLAS

Å:	Angström
APS:	Persulfato de amônio
BSA:	Albumina sérica bovina
°C:	Graus Celsius
CaCl ₂ :	Cloreto de cálcio
Ca ²⁺ :	Cálcio iônico
g:	Grama
HCl:	Ácido clorídrico
HIV:	Human immunodeficiency vírus
INFAR:	Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular
IgE:	Imunoglobulina E
KDa:	KiloDalton
mA:	MiliAmper
mg:	Miligrama
ml:	Mililitro
mm:	Milímetro
Mn ²⁺ :	Íon Manganês
mM:	Milimolar
M:	Molar
NaCl:	Cloreto de sódio
nm:	Nanômetro
µm:	Micrometro
µl:	Microlitro
<i>P.paulista</i> :	<i>Polybia paulista</i>
PBS:	Salina Tamponada com fosfato
pH:	Potencial Hidrogeniônico
RCF:	Força Centrífuga Relativa
SDS:	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE:	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SISBIO:	Sistema de autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen:	Sistema Nacional de Gestão do patrimônio genético e do conhecimento Tradicional Associado
Zn ²⁺ :	Íon zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
3	REVISÃO LITERATURA.....	13
3.1	<i>POLYBIA PAULISTA</i>	13
3.1.1	Patofisiológica do envenenamento.....	14
3.1.2	Composição do veneno da <i>Polybia paulista</i>	14
3.1.3	Proteases.....	16
3.2	INIBIDORES DE PROTEASES.....	18
3.2.1	Tipos de inibidores.....	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	AUTORIZAÇÃO.....	23
4.2	OBTENÇÃO DAS VESPAS.....	23
4.3	FRACIONAMENTO DOS ANIMAIS.....	24
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO DA GLÂNDULA DE VENENO DA <i>POLYBIA PAULISTA</i>	24
4.5	DOSAGEM DAS PROTEÍNAS.....	25
4.6	ANÁLISE DA PRESENÇA DO INIBIDOR DE PROTEASE USANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE EXTRATO DE GLÂNDULA DE VENENO DE <i>P. PAULISTA</i>	25
4.7	ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO B-MERCAPTOETANOL EM TEMPERATURA.....	26
4.8	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEASE, UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E SUBSTRATOS DIFERENTES.....	26
4.8.1	Preparo dos géis com diferentes substratos.....	26
4.8.2	Preparo das enzimas proteolíticas e seus respectivos tampões.....	27
4.8.2.1	Tripsina	27
4.8.2.2	Papaína	27
4.8.2.3	α-Quimotripsina	27
4.8.2.4	Proteinase K	28
4.8.2.5	Pepsina	28
4.9	CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR.....	28
4.9.1	Coleta e extração da glândula secretora do veneno.....	28
4.9.2	Padronizações do processo cromatográfico.....	29
4.9.3	Cromatografia do extrato de glândula de <i>P.paulista</i>	29
4.9.4	Identificação da presença de inibidores de protease nas frações cromatográficas.....	30
5	RESULTADOS.....	31
5.1	ANÁLISE DA PRESENÇA DO INIBIDOR DE PROTEASE USANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE EXTRATO DE GLÂNDULA DE VENENO DE <i>P. PAULISTA</i>	31
5.2	ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO B-MERCAPTOETANOL EM TEMPERATURA.....	32
5.3	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM TRIPSINA.....	33
5.4	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM PAPAÍNA.....	34

5.5	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM α -QUIMOTRIPSINA.....	35
5.6	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM PEPSINA.....	36
5.7	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM PROTEINASE K.....	37
5.8	CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR.....	38
5.9	ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS EM TEMPOS DIFERENTES.....	40
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO A – Certidão SisGen	50
	ANEXO B – Certidão SISBIO.....	51

1 INTRODUÇÃO

Considerando o crescente registro de acidentes com vespa no Brasil, em especial a vespa social *Polybia paulista*, presente geralmente em áreas urbanas, o estudo da composição do seu veneno se faz necessário e conhecer seus respectivos mecanismos de ação é fundamental, pois ajuda entender os processos patofisiológicos durante o envenenamento, além de auxiliar na escolha e no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas usadas quando há acidentes com envenenamento.

O veneno da vespa, assim como de outros animais de ordem Hymenoptera, é o importante instrumento de defesa individual e da colônia. De forma geral, as principais toxinas encontradas no veneno da vespa *P. paulista* são fosfolipases, hialuronidase, antígeno 5, mastoparanos e proteases. Os inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontradas em produtos de origem animal, vegetal ou em microrganismos. São moléculas que têm a capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas, formando complexos estáveis com proteases alvo, bloqueando ou alterando o acesso ao sítio ativo da proteína. Dessa forma, de acordo com diversos autores, investigar as propriedades biológicas e farmacológicas de inibidores de proteases é fundamental para compreender seus mecanismos em processos patofisiológicos, além da potencial utilização para fins econômicos e terapêuticos.

Neste trabalho, o objetivo foi a identificação e caracterização de inibidores de protease no extrato de veneno de *P. paulista*. O trabalho se iniciou pela identificação e caracterização da presença do inibidor de protease por zimografia reversa, utilizando diferentes substratos; gelatina 1%, caseína 1%, ovoalbumina 0,3%, e albumina sérica bovina (BSA) 0,3%; da mesma forma, a caracterização dos substratos após a incubação com diferentes enzimas proteolíticas: tripsina, papaína, α -quimotripsina, proteinase k e pepsina. Após esse processo foi realizado o enriquecimento dos componentes proteicos do extrato do veneno de *P. paulista* por cromatografia por exclusão de tamanho utilizando coluna Yara Phenomenex Sec. 2000, o que possibilitou o rastreamento das eluições para encontrar o inibidor de protease das frações cromatográficas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar e caracterizar os inibidores de proteases, presente no extrato da glândula do veneno de *Polybia paulista*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença do inibidor de protease no extrato de glândula de veneno de *Polybia paulista* por zimografia reversa.
- Analisar a influência do β -mercaptoetanol com e sem aquecimento, nos inibidores de protease
- Caracterizar o inibidor de protease por zimografia reversa utilizando diferentes substratos; gelatina 1%, caseína 1%, ovoalbumina 0,3%, e albumina sérica bovina (BSA) 0,3%.
- Classificar os inibidores de protease utilizando diferentes classes de enzimas proteolíticas: tripsina, papaína, quimotripsina, proteinase K e pepsina
- Realizar a purificação dos componentes proteicos do extrato de glândula de veneno de *P. paulista*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *POLYBIA PAULISTA*

Também conhecidas popularmente como Paulistinha e Marimbondo-chumbinho, a *Polybia paulista* (HERMANN VON ILHERING, 1896) é uma vespa social neotropical predominante na zona urbana devido ao desmatamento de seu *habitat* natural (AGUIAR, 2006). Ela é encontrada principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás, com registros também na Argentina e no Paraguai. (MACHADO, 1983).

A vespa *P. paulista* pertence à mesma ordem (Hymenoptera) das abelhas (Apoidea) e das formigas (Formicidae). Quanto às suas características específicas, a vespa *P. paulista* apresenta coloração preta, escutelo amarelo (MACHADO, 1983) e aparelho inoculador de veneno na extremidade do abdômen (ferrão), o qual promove paralisia em presas e funciona como instrumento de defesa do animal (WHITFIELD et al., 1998).

Figura 1: *Polybia paulista*



Fonte: Os autores.

As vespas possuem a característica de formar grandes colônias (1 a 5 mil indivíduos), construir seus ninhos com vários favos, usando materiais vegetais que são coletados, triturados e umedecidos com secreção. Os ninhos são envolvidos por uma cobertura protetora com um único orifício de acesso, o que a diferencia das demais espécies do gênero *Polybia* (AGUIAR, 2006). As fundações de novos ninhos ocorrem o ano todo, independentemente das condições climáticas. A sua alimentação é composta por proteínas (insetos), carboidratos (néctar), polpa de madeira e água (CASTRO; PALMA, 2009). A maioria desenvolveu glândulas especializadas para a produção de veneno e um aparelho de ferroar, os quais podem ser utilizados tanto na caça de presas quanto em sua própria defesa. Assim, o estudo do veneno torna-se bastante

importante para melhor compreendermos as alergias ocasionadas pelos acidentes por ferroadas causadas por estes insetos (STEEN, 2005).

3.1.1 Patofisiológica do envenenamento

De Castro e Silva et al. (2016) e Brigatte (2011) registraram o crescimento dos casos de acidentes com vespa no Brasil. Dados de 2016 revelaram uma média de 10 mil acidentes registrados anualmente. Também registram que desse total, uma quinta parte refere-se a casos graves em hospitais. Neste sentido, torna-se essencial a caracterização de seu veneno.

Quanto ao quadro clínico, Golden (1987) aponta para fatores ligados à sensibilidade das toxinas presentes no veneno da vespa, dependendo do número de ferroadas e do local onde ocorreu o envenenamento. O envenenamento apresenta sintomas característicos para a situação de pacientes não-alérgicos e não-mediados por imunoglobulina E (IgE), como dor, inchaço, coceira e vermelhidão (sintomas que desaparecem após algumas horas). Alguns pacientes mais suscetíveis ao veneno podem evoluir para casos de náusea, cefaleia e fadiga (GOLDEN, 1987).

Quanto aos alérgicos – dependentes de IgE – os sintomas variam entre reações locais ou sistêmicas. As locais caracterizam-se por sintomas brandos de reações alérgicas. Nas sistêmicas, beneficiadas em casos de grande quantidade de picadas ou acidentes ocorrentes em um curto intervalo de tempo, identificam-se eritema e angioedema. Em alguns casos, podem levar à morte, especialmente por obstrução respiratória e hipotensão, podendo ocorrer com apenas uma picada (FITZGERALD et al., 2006; GOLDEN, 1987).

Acidentes envolvendo himenópteras são usualmente encontrados em países do continente americano, principalmente nos que habitam espécies da família Vespidae (DE CASTRO E SILVA et al., 2016). Já na América do Sul, os acidentes ocorridos nos seres humanos causados pelo veneno da vespa são negligenciados, principalmente pela falta de estudos farmacológicos e epidemiológicos na área (MEDEIROS, 2003).

3.1.2 Composição do veneno da *Polybia paulista*

Mesmo não havendo muitas informações a respeito da composição peptídica do veneno, fator que ocorre devido à produção limitada do veneno pela vespa e pela baixa abundância de cada peptídeo natural, considera-se que 70% dos componentes do veneno da vespa são peptídeos (DIAS et al., 2014). Outra explicação para o baixo rendimento de veneno pelas vespas sociais é dada por De Souza et al. (2004), que aponta que a maior parte das espécies possui

comunidades com poucos indivíduos, dificultando dessa forma os estudos sobre o veneno de *P. paulista*.

Perez et al. (2015) destaca que o veneno é uma complexa mistura de compostos de alto e baixo peso molecular e a sua caracterização molecular é um avanço no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e terapias seguras e eficientes. Neste sentido, estudos mostram que o veneno da himenóptera contém uma grande variedade de proteínas como fosfolipases (A e B), hialuronidases, antígeno-5, proteases e componentes peptídeos, dentre os quais, encontram-se os mastoparanos (DE GRAAF et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2010).

As fosfolipases são encontradas nos mais diversos tipos de organismos vivos. Sua principal função biológica é derivada da sua capacidade em catalisar a hidrólise de uma ou mais ligações de éster que constituem os fosfoglicerídeos. Teixeira et al. (2003) explicam que a liberação de histamina e serotonina liberadas devido o rompimento da membrana de mastócitos pode resultar em aumento da permeabilidade vascular, hiperalgésia, edema e quimiotaxia de neutrófilos. No veneno da vespa *P. paulista*, Santos et al. (2007) identificaram uma fosfolipase A1 de massa molecular 34kDa com atividade hemolítica, além de um potencial efeito alergênico observado pela imunorreação dessa proteína com IgE. Um estudo realizado por De Oliveira e Palma (1998) identificou e caracterizou quatro PLA2 no veneno de *P. paulista* e as denominou como polybitoxinas. No envenenamento, essas toxinas podem promover um elevado processo de hemólise. As atividades das polybitoxinas são dependentes do íon Ca^{2+} e fracamente de outros íons bivalentes como estrôncio, bário e magnésio (DE OLIVEIRA; PALMA, 1998).

A hialuronidase é uma glicoproteína de 45 kDa, KOLARICH et al (2005) que constitui em um grupo de enzimas que hidrolisa o ácido hialurônico. Pela ação da hialuronidase, o ácido hialurônico é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo a sua viscosidade e facilitando a difusão dos componentes do veneno para o interior da célula (RICHERS, 1982; SANTOS et al., 2010). Além de participar da dissipação de substâncias nocivas, pode também ser responsável por um quadro de inflamação ao redor do local onde ocorreu a ferroadada. Nos venenos de vespas, abelhas e escorpiões, são capazes de provocar reações anafiláticas severas e fatais (JUSTO JACOMINI et al., 2013; MARKOVIĆ-HOUSLEY et al., 2000). Em estudo realizado em 2013, por Justo Jacomini e colaboradores (2013), utilizou-se uma abordagem proteômica descrevendo a clonagem, o sequenciamento e a estrutura 3D da hialuronidase do veneno de *P. paulista*.

O antígeno-5 é comumente encontrado no veneno dos insetos, sendo o maior constituinte proteico no veneno de vespas. No estudo realizado por Santos et al. (2010),

identificaram-se seis isoformas de antígenos -5 no veneno da vespa *P. paulista* que se mostraram imunogênicas ao reagirem com IgE específica presente no soro de pacientes sensíveis ao veneno da espécie.

Entre os componentes peptídicos, os de degranulação de mastócitos e os quimiotáticos estão entre os principais componentes dos venenos de vespa (HIRAI et al., 1979). Os mastoparanos são tetradecapeptídeos aminados responsáveis pela liberação de histamina dos mastócitos, da serotonina das plaquetas e das catecolaminas (NAKAJIMA et al., 1986). Foram identificados no veneno da vespa *P. paulista* três mastoparanos: Polybia-MP I, Polybia-MP II e Polybia-MP III, todos com estrutura formada por 14 resíduos de aminoácidos.

Segundo Matsuzaki et al. (1996), as atividades biológicas apresentadas pelos mastoparanos estão altamente relacionadas com a interação dos peptídeos com membranas biológicas, causando perturbações nas bicamadas lipídicas e levando a um aumento na permeabilidade das membranas.

De Souza et al. (2009) mostrou que Polybia-MP II e MP III possuem atividades hemolítica, quimiotática para leucócitos polimorfonucleares, antimicrobiana contra gram-positivos e gram-negativos e degranulação de mastócitos; já o mastoparanos Polybia-MP I, apesar de ter amplo espectro bactericida contra gram-positivos e gram-negativos, difere dos peptídeos anteriormente mencionados por não ter ação hemolítica, além de inibir o crescimento de algumas células tumorais principalmente no câncer de próstata e de bexiga.

O segundo grupo mais importante de peptídeos biologicamente ativos de venenos de vespas são os peptídeos quimiotáticos; são tridecapeptídeos que apresentam muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e geralmente um único resíduo básico. Eles geralmente atraem macrófagos e leucócitos polimorfonucleares para a região ao redor do local da picada (YASUHARA et al., 1983).

3.1.3 Proteases

As proteases compõem um dos mais amplos e importantes grupos de enzimas. Realizam uma variedade de funções essenciais para todos os organismos (BARRETT, 1987). Estas enzimas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas, desempenhando diversas funções fisiológicas, tais como ações no processo digestivo, coagulação sanguínea, atividades na fertilização, fibrinólise, ativação de zimogênios, angiogênese e proliferação de tecidos (COSTA et al., 2010; NEURATH, 1983).

A atividade proteolítica é essencial para o desempenho de muitos processos celulares, mas também pode estar envolvida em processos patológicos devido à atividade enzimática desregulada (BARRETT, 1987).

As proteases são classificadas em grupos ou famílias de acordo com o tipo de reação catalisada e podem ser divididas em endopeptidases (quando clivam ligações peptídicas internas) e exopeptidases (quando clivam ligações N-terminal ou C-terminal) (BARRETT, 1994; GOMES, 2014). Quanto à natureza química do sítio catalítico e a relação evolutiva baseada na sua estrutura, as proteases são classificadas em serino proteases, cisteíno proteases, aspartato proteases e metaloprotease (COSTA et al., 2010).

As serino proteases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em vírus, bactérias e organismos eucariontes. Compreendem duas famílias distintas: a família da quimotripsina, que inclui enzimas de mamíferos como tripsina, quimotripsina e elastase, e a família da subtilisina, que inclui enzimas bacterianas como a subtilisina. As famílias possuem estruturas tridimensionais distintas, mas a geometria do sítio ativo é semelhante e a catálise ocorre por meio do mesmo mecanismo (BARRETT et al., 1986). São caracterizadas por possuírem um resíduo de serina, normalmente formando uma tríade com aspartato e histidina responsável pela atividade catalítica no sítio ativo dessa protease. A maioria das serino proteases possuem atividade em meio neutro ou alcalino, com Ph ótimo de atividade, que varia de 7 a 11 (HEDSTROM, 2002; RAO et al., 1998).

Cisteíno proteases, também conhecidas como tiol proteases, são enzimas proteolíticas isoladas tanto em procariontes quanto em eucariontes. Geralmente, estas enzimas são encontradas nos vacúolos e são responsáveis pela mobilização de proteínas estocadas no endosperma durante a germinação das sementes (ARAI et al., 2002). Elas são encontradas também no meio extracelular (BARRET; RAWLINGS, 1993).

A papaína, extraída do látex de *Carica papaya*, foi a primeira enzima da família a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia por raio X e é hoje o membro mais estudado da família (MONTI et al., 2000). A ação catalítica de uma cisteíno protease depende de uma díade formada por cisteína e histidina. A maioria das cisteíno proteases possui um Ph ótimo de atividade próximo ao neutro (Ph 7). Entretanto, existem algumas cisteíno proteases em que esse valor está em meio ácido, como por exemplo, os presentes nos lisossomos. As suas atividades são suscetíveis a agentes sulfidríla (RAO et al., 1998).

Aspartato proteases são comumente conhecidas como proteases ácidas por possuir atividade catalítica associada aos resíduos de ácido aspártico. A maioria pertence à família pepsina, a qual inclui enzimas digestivas como pepsina e catepsina D, assim como em algumas

proteases em fungos. A segunda família inclui as proteases virais, como a protease do vírus HIV. Estas enzimas são moléculas bilobadas; em cada lobo, possui um resíduo de ácido aspártico, formando uma díade catalítica no sítio localizado entre os dois lobos (RAWLINGS et al., 2004). Encontradas em organismos procariontes e eucariontes, estas enzimas desempenham diversas ações fisiológicas. As Aspartato proteases possuem Ph ótimo de atividade em condições ácidas entre 3 e 4 (RAO et al., 1998).

A atividade da metaloprotease depende da ligação de íons metálico bivalentes (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}), e pode ser encontrada em variadas fontes, através de organismos procariontes ou eucariontes. São as enzimas proteolíticas que possuem os mais diversos tipos de sítios catalíticos, dependentes da ligação de um metal (geralmente o zinco em seu sítio ativo). O Ph ótimo de atividade das enzimas pertencentes a esse grupo pode estar na faixa considerada ácida, básica ou neutra, e são inibidas pela adição de agentes quelantes, como por exemplo a EDTA ou por um processo de diálise (BARRETT, 1995; RAO et al., 1998).

3.2 INIBIDORES DE PROTEASES

Os inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em produtos de origem animal, vegetal ou em microrganismos. São moléculas que têm a capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas, formando complexos estáveis com proteases alvo, bloqueando ou alterando o acesso ao sítio ativo da proteína (MACEDO et al, 2007). A sua classificação pode ser dada em quatro tipos: inibidores de serino protease, inibidores de cisteíno protease, inibidores de aspartato protease e inibidores de metaloprotease. Estas são determinadas a partir dos aminoácidos e o centro de reação (KOIWA et al., 1997).

Diferentes estudos, a exemplo de Barrett (2004), asseguram que, para controlar o excesso de atividade catalítica de proteases, vários mecanismos fisiológicos existem, dentre os quais a interação com inibidores de proteases que inibem a atividade das enzimas com elevada afinidade e especificidade (LEUNG et al.; 2000; RAWLINGS et al.; 1993).

O sistema de classificação dos inibidores de protease apresentado por Rawlings (et al., 2004) não se baseia apenas na classe da protease inibida; as famílias são formadas segundo a homologia nas sequências de aminoácidos – estrutura primária – de proteínas e peptídeos. Nesse sistema, os inibidores foram divididos em 48 famílias. As famílias foram organizadas em clãs conforme uma linha evolutiva comum ou pela similaridade da estrutura terciária.

Investigar as propriedades biológicas e farmacológicas de inibidores de proteases é fundamental para compreender seus mecanismos em processos patofisiológicos, além da potencial utilização para fins econômicos e terapêuticos (HASEGAWA, 1997).

Entre as diversas fontes, inibidores de proteases obtidos de plantas encontram-se entre os mais estudados por agregar significativa importância para o setor agrícola. Dentre as funções realizadas, encontra-se a proteção contra pragas e patógenos, inibindo proteases exógenas de artrópodes e de microrganismos fitopatógenos, além de efetuar a regulação de algumas proteases endógenas durante o período da dormência das sementes (CARRILLO et al., 2011; KOIWA et al., 1997).

Os inibidores de proteases são proteínas que inativam endopeptidases e exopeptidases. Em animais, os inibidores de protease podem impedir os eventos de proteólise indesejados, regulando diversas proteases. São utilizados como agentes terapêuticos, na coagulação sanguínea, doenças retrovirais (HIV) e no câncer (mastoparâneos). Tendo em vista as diversas aplicações dos inibidores de protease, a descoberta por novos inibidores de protease tem despertado um grande interesse para fins comerciais (GIANOTTI, 2008).

3.2.1 Tipos de inibidores

Segundo Koiwa et al (1997), os inibidores de proteases são os mais abundantes. Estas enzimas proteolíticas participam de processos como apoptose celular, coagulação sanguínea, resposta inflamatória e vias de processamento hormonal; ao bloqueá-las, estes inibidores afetam os processos de carcinogênese, fatores de crescimento e receptores em vias de sinalização celular (IVANOV et al., 2006; QI et al., 2005).

Os inibidores naturais de tripsina, também conhecidos como serino protease inibidores (serpinas), são a maior e mais diversa família de inibidores de protease (RAWLING et al, 2004). Segundo Laskowski e Kato (1980), o mecanismo de interação entre inibidores e as serino proteases se dá pela formação de um complexo entre enzima e inibidor, que ocorre a partir da interação do sítio ativo entre ambos. Os inibidores de serino protease pertencem à classe das serino proteases como o seu nome, a qual pertencem proteases como tripsina e quimotripsina, responsáveis pela digestão inicial de proteínas de muitos animais.

Existem muitos mais estudos sobre inibidores de serino protease (HAQ et al, 2004) que em relação às três classes descritas por Koiwa. São determinados pela homologia entre seus membros, na similaridade de sequência e no mecanismo de ligação (LASKOWSKI KATO,

1980). De acordo com o domínio de ligação, os inibidores de serino proteases se dividem em Kunitz, Kazal e pacifastina.

A família de inibidores serino protease tipo Kunitz-BPTI (inibidor de tripsina pancreática bovina) apresenta esse nome por ser a primeira caracterização de inibidor desta família, a fim de se diferir do Kunitz presente nas plantas (BODE; HUBER, 1993). Ela apresenta uma pequena massa molecular equivalente em média a 10 kDa, aproximadamente 60 aminoácidos e três pontes dissulfeto (HE et al, 2003; KRESS et al., 2004; ZUPUNSKI, 2003). Figura 2.

Figura 2: Inibidor de tripsina pancreática bovina (bovino pâncreas)

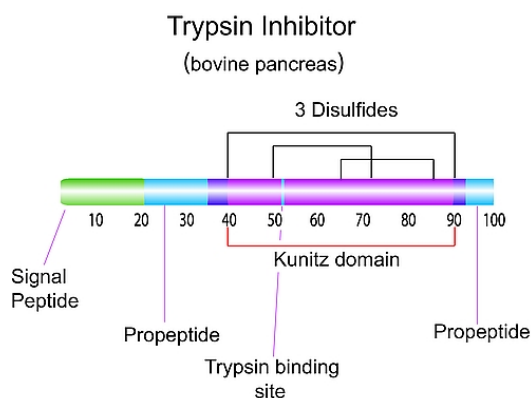


Imagem disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/T0256?lang=pt®ion=BR>>, acesso 10 nov. 2019.

Os membros dessa família de inibidores também foram identificados e isolados a partir de insetos. Na hemolinfa de *Bombyx mori*, nove inibidores do tipo Kunitz-BPTI foram detectados pela sua atividade sobre quimotripsina (HE et al., 2003). Esta família de inibidores é uma das mais expressivas e já foi relatada no veneno das serpentes, aranhas, escorpiões, abelhas, vespas e outros animais.

MuKherjee et al. (2014) relaram pela primeira vez a atividade anti-trombinas de um inibidor de protease tipo Kunitz no veneno da serpente *Daboia russelli russelli*. Neste estudo, foi mostrada a presença de um suposto domínio conservado da família Kunitz, com massa molecular de 6,9 kDa, tipicamente presente no tamanho dos peptídeos do tipo Kunitz- BPTI.

Lee et al. (2013) identificaram o primeiro inibidor de serino protease do tipo Kunitz no veneno de aranha *Arankus ventricosus* com ação inibitória na plasmina e elastase, o qual age de forma antifibrinolítica; Qiu et al. (2013) descreveram um peptídeo de 58 aminoácidos recombinante no veneno da abelha *Bombus terrestris*, que demonstrou atividade semelhante aos

inibidores de tripsina do tipo Kunitz. Esse estudo não observou efeitos inibitórios no Fator Xa e na trombina, mas sim na plasmina, como relatado no estudo anterior.

O estudo proteômico de dos Santos et al. (2010) indica a presença de pelo menos três inibidores de proteases no veneno da vespa *P. paulista*. Inibidores de proteases foram identificados e caracterizados no veneno de espécies da ordem *Hymenoptera* no trabalho realizado por Choo et al. (2012), tendo sido identificado no veneno do zangão *Bumbus ignitus* um inibidor de serino proteases do tipo Kunitz com ação inibitória *in vitro* sobre a plasmina. Neste trabalho, observa-se que o inibidor de serino protease do veneno tem como alvo a plasmina mais que a serino protease do veneno e verifica-se um novo mecanismo pelo qual o veneno de abelha afeta o sistema hemostático (CHOO et al., 2012).

Os inibidores do tipo Kazal, também pertencentes aos inibidores do tipo serino protease, compartilham de uma sequência primária conservada e conformação molecular (uma α -hélice central e três poucas folhas β -antiparalelas). Cada domínio consiste em 50-60 aminoácidos com seis cisteínas conservadas que dão forma ao intradomínio de três pontes de dissulfeto (RAMALHO et al., 2014). Figura 3.

Figura 3: Inibidor de tripsina do ovo de galinha (Type II-O)

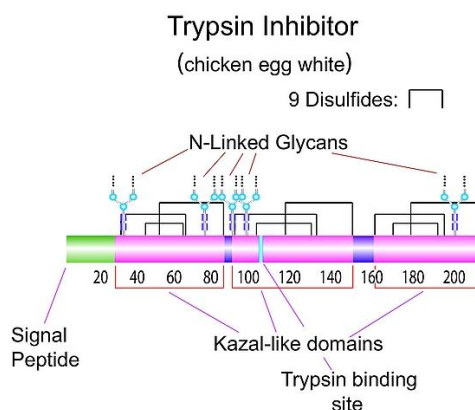


Imagem disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/T0256?lang=pt®ion=BR>>, acesso 10 nov. 2019.

Zheng et al. (2007) identificaram um inibidor de protease nas pupas do bicho da seda *Bombyx mori* com domínios semelhantes ao dos inibidores do serino tipo Kazal, demonstrando ser um inibidor específico de subtilisina.

Os membros da família da pacifastina, segundo Breugelmans (2009), são inibidores da serina peptidase encontrados em artrópodes e que possuem muitos membros dentro de diferentes ordens de insetos.

Neste contexto, identificar e caracterizar a complexa mistura de componentes encontrados no extrato de glândula de veneno de *P.paulista*, é fundamental, visto que os inibidores estão amplamente distribuídos na natureza e, dependendo dos domínios estruturais e classe que se enquadram, desempenham ações fisiológicas diversas, como já citados por alguns autores, possuem atividade hemolítica, e atividades sobre os fatores da coagulação como a plasmina e trombina.

Portanto, esse trabalho tem por objetivo identificar e caracterizar inibidores de protease presente no extrato de glândula de veneno de *P. paulista*, por meio da zimografia reversa utilizando diferentes enzimas proteolíticas e substratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AUTORIZAÇÃO

Esse trabalho está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do patrimônio genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen – nº ABFE32F, conforme anexo A e encontra-se aprovado no Sistema de autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO nº 71078 conforme anexo B.

4.2 OBTENÇÃO DAS VESPAS

Para a execução deste trabalho foram utilizados dois ninhos de vespa *P. paulista*. O primeiro ninho foi coletado na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus de Uvaranas, em Ponta Grossa-PR, Latitude -25,0949240 e Longitude -50,1067885 no mês de janeiro de 2018 e foi utilizado nos experimentos de zimografia reversa. O segundo ninho foi coletado no mesmo campus da instituição, Latitude -25,0933 e Longitude -50,1654, coletado no mês de agosto do mesmo ano, utilizado para a cromatografia por exclusão molecular.

Os ninhos foram coletados no início da noite, período no qual o metabolismo e atividade das vespas diminui. O ninho foi envolto em saco plástico rígido e logo após, com o auxílio de uma espátula metálica, foi desprendido do local de fixação (processo demonstrado na Figura 2). Após o seu desprendimento, o saco plástico foi imediatamente fechado e colocado em freezer a uma temperatura de -20°C para promover a morte dos animais, conforme descrito por Souza e colaboradores (2004).

Figura 4: Local de fixação do ninho e procedimento da coleta.



A - Procedimento de coleta do ninho 1. B - Local de fixação do ninho

Fonte: Imagem produzida pelos autores.

4.3 FRACIONAMENTO DOS ANIMAIS

O fracionamento do ninho ocorreu após 36 horas de armazenamento no freezer a -20°C. Cada alíquota foi composta de 400 animais que foram colocados em potes plásticos (Proinlab), os quais foram novamente armazenados no freezer para posterior extração das glândulas de veneno, imediatamente antes das análises de zimografia reversa. O ninho 1 totalizou 8.360 animais e o ninho 2, 8.970 animais.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO DA GLÂNDULA DE VENENO DA *POLYBIA PAULISTA*

Para a obtenção do veneno da glândula, todo o aparato inoculador (ferrão mais glândula produtora) foi removido por dissecação manual com auxílio de uma pinça de ponta fina e mantido em microtubo contendo 1 ml de salina tamponada com fosfato –PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄) equilibrado para pH 7,4. Após a coleta desses aparatos de cada alíquota (400 vespas/alíquota), as glândulas foram cuidadosamente pressionadas de forma a permitir o extravasamento de seu conteúdo dentro do tampão. Para separar a solução contendo o extrato da glândula da estrutura tecidual (aparatos e ferrão), a amostra foi imediatamente centrifugada a 20.000 RCF por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Centrifuge 5430 R – Eppendorf, Hamburgo – Alemanha). O sobrenadante foi removido e transferido para um novo microtubo identificado e armazenado no freezer a -20°C para posterior análise.

4.5 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS

A concentração das proteínas totais presentes nos extratos foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). A dosagem foi feita em placa de 96 poços usando o Reagente concentrado Bio-Rad Protein Assay Dye (Bio-Rad, Hercules – Estados Unidos) e a leitura foi realizada no leitor de microplaca multidetecção Synergy H1 Hybrid Reader (Biotek Instruments, Winooski – Estados Unidos) em comprimento de onda de 595 nm.

A dosagem proteica foi feita para cada alíquota com 400 vespas e nas frações resultantes do enriquecimento cromatográfico.

4.6 ANÁLISE DA PRESENÇA DO INIBIDOR DE PROTEASE USANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE EXTRATO DE GLÂNDULA DE VENENO DE *POLYBIA PAULISTA*

A análise da presença de inibidor de protease do extrato de glândula da vespa *P. paulista* foi realizada pela técnica de zimografia reversa. Foram realizados vários experimentos com diferentes concentrações de poliacrilamida copolimerizado com 1% de gelatina (Difco, Brasil). Com base em trabalhos anteriores realizados no laboratório, que mostraram a presença de inibidores próximos a 100 kDa, optou-se pela concentração de poliacrilamida de 8,5%.

As amostras foram preparadas com quantidades de extrato de glândula equivalentes a 5 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg e 80 µg em tampão de amostra Laemmli, em condições não redutoras e foram aplicadas em gel de zimografia utilizando o sistema de cuba eletroforética *Mini-Protean* (Bio-Rad, Estados Unidos).

A eletroforese ocorreu sob corrente constante 15 mA a 4°C a 8°C. Utilizou-se para estimar a migração eletroforética aparente o padrão de massa molecular *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad, Estados Unidos). Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados duas vezes por 20 minutos com uma solução de 2,5% de polissorbato 80 – Tween (Vetec, Brasil) em agitação constante.

O padrão de massa molecular foi separado em um tubo contendo solução de metanol 50% (Biotec, Brasil), a parte do gel com as amostras de extrato de glândula foi incubada em estufa a 37°C por 12 a 16 horas em uma solução contendo 50 mM de TRIS-HCl pH 7,4 (Bio-Rad, Estados Unidos) e tripsina 1mg/ml T7409 (Sigma Aldrich –USA). Como controle da atividade enzimática da tripsina, a última faixa do gel foi cortada e incubada com o tampão ótimo para tripsina (50 mM de Tris-HCl pH 7,4). Após a incubação, a porção do gel com as amostras e a última faixa do gel foram corados em solução de coloração (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, Estados Unidos), 10% ácido acético glacial e 50% metanol sob agitação (Orbital Shaker) por 30 minutos. Depois foram descorados com solução descorante metanol 50%.

Os géis foram reidratados com água destilada e colocados em transparências (Transparency Line). Realizou-se a estimativa da migração eletroforética e foram fotodigitalizados em scanner Epson Stylus CX5600. Depois, realizou-se a densitometria através da quantificação das bandas visualizadas. Esta análise foi realizada pelo programa de análise de imagem ImageJ 5.0 (National Institutes of Health, USA), obtendo-se dados numéricos representativos da quantificação das bandas, os quais foram submetidos à análise

estatística de variância de uma via (ANOVA One-Way) no programa GraphPad Prism versão 8.0. (GraphPad Software, La Jolla, USA).

4.7 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO β -MERCAPTOETANOL EM TEMPERATURA

Os ensaios para analisar a influência do β -mercaptoetanol com a temperatura foram realizados por zimografia reversa 8,5%, copolimerizado com 1% de gelatina e incubado com 1mg/ml tripsina.

A eletroforese e a incubação procederam da mesma forma como descrito no item 4.6, com 30 μ g de extrato de glândula preparadas em condições redutoras e não redutoras sem aquecimento e com aquecimento a 100°C por 10 minutos em banho seco (LGC Biotecnologia DB-100). Para o preparo do tampão em condições redutoras, adicionou-se ao tampão de amostra 5% de β -mercaptoetanol.

4.8 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEASE, UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E SUBSTRATOS DIFERENTES

Para a análise com diferentes substratos e enzimas proteolíticas, utilizou-se 30 μ g de amostra de extrato de glândula de veneno sob condições redutoras e não redutoras e com aquecimento e sem aquecimento.

4.8.1 Preparo dos géis com diferentes substratos

A identificação foi realizada em quatro substratos: gelatina 1% (Difco, Brasil) preparada em H₂O, caseína 1% (Merck – Alemanha) preparada em PBS (ambas foram colocadas no microondas por 1 minuto (Electrolux ME 28S), BSA 0,3% preparada em PBS e ovoalbumina 0,3% preparada em PBS, homogeneizadas em Vortex (Vision) por 1 minuto.

Os géis de SDS-PAGE 8,5 % copolimerizados com os diferentes substratos foram preparados ao mesmo tempo. A corrida eletroforética também aconteceu ao mesmo tempo, utilizando o sistema de cuba eletroforética para 4 géis *Mini-Protean* (Bio-Rad, Estados Unidos). Para o preparo de cada gel (6 ml totais de solução de gel), utilizou-se 2,8 ml da solução de cada substrato. O procedimento se deu conforme descrito no item 4.6.

4.8.2 Preparo das enzimas proteolíticas e seus respectivos tampões

4.8.2.1 **Tripsina**

Para o preparo da solução estoque de tripsina 1mg/ml, utilizou-se tripsina de pâncreas suíno (T7409, Sigma Aldrich –USA), a qual foi diluída em HCl 1mM e cujo procedimento foi feito em gelo. Foram feitas alíquotas de 400µl que foram acondicionados em freezer a -20°C.

Para cada experimento, uma alíquota era imediatamente descongelada e utilizada em 100ml de tampão. Obteve-se desta forma a concentração final de 4µ/ml de tripsina no tampão de incubação.

O tampão de incubação do gel com a tripsina foi 50mM de Tris-HCl pH 7,4, preparado no momento do uso.

4.8.2.2 **Papaína**

Uma solução estoque de papaína 2mg/ml foi preparada usando papaína de mamão carica (76220, Sigma Aldrich – USA) diluída em água ultrapura. Foram feitas alíquotas de 1 ml, as quais foram acondicionadas em freezer a -20°C.

Para o tampão de incubação para Papaína, utilizou-se 400 ml de uma solução 50 mM de TRIS. Foram acrescentados 4 ml de solução 5 mM L-cisteína-HCl (Via Farma – China). Logo após a estabilização da solução, foi corrigido o pH para 7,0. Imediatamente antes do uso, a cada 200 ml de tampão de incubação foi acrescentada uma alíquota de solução estoque de papaína previamente preparada, obtendo-se 10 µg/ml de papaína no tampão de incubação.

4.8.2.3 **α -Quimotripsina**

Para o preparo de solução estoque de α -quimotripsina 2 mg/ml, foi utilizada α -quimotripsina de pâncreas bovino (C4129, Sigma-Aldrich –USA) diluída em HCl 1 M acrescida de 2 mM CaCl₂. A solução estoque foi alíquotada em 1 ml por microtubo, os quais foram acondicionados em freezer a -20°C.

Para o preparo do tampão de incubação para α -quimotripsina, utilizou-se uma solução a 50 mM de Tris-HCl pH 7,8. Imediatamente antes do uso, a cada 100 ml de tampão, foram acrescentados 10 mM CaCl₂ e uma alíquota de α -quimotripsina para cada 200 ml de incubação.

4.8.2.4 Proteinase K

A solução estoque de proteinase-K 1 mg/ml foi preparada utilizando-se Proteinase K – P2308 (Sigma-Aldrich –USA) diluída em 50mM Tris-HCl pH 8,0. Foram feitas alíquotas com 1 ml por microtubo, que foram armazenados em freezer a -20°C.

Para o preparo do tampão de incubação para proteinase K utilizou-se 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, e imediatamente antes do uso, foram acrescidas 5 mM CaCl₂ e uma alíquota da solução estoque de proteinase K a cada 100 ml de incubação.

4.8.2.5 Pepsina

Uma solução estoque de pepsina 1 mg/ml foi preparada utilizando-se pepsina de mucosa gástrica suína (Merck – Alemanha) diluída em HCl 10mM. Foram feitas alíquotas de 2 ml, as quais foram protegidas da luz com papel alumínio e armazenadas em freezer a -20°C.

Para o tampão de incubação de pepsina foi preparado uma solução tampão 50 mM de glicina pH 2,0. Imediatamente antes do uso, acrescentou-se 1 alíquota de 2 ml de solução de estoque para cada 200 ml de tampão de incubação.

4.9 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR

O processo de cromatografia por exclusão molecular foi realizado em parceria com o Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR) da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP).

4.9.1 Coleta e extração da glândula secretora do veneno

Para a coleta, a extração e a dosagem de proteínas do extrato do veneno, procedeu-se o mesmo modo dos itens anteriormente descritos. Porém, as glândulas foram coletadas todas em 1 ml de PBS a 4°C, tomando-se o cuidado para que apenas as glândulas permanecessem no tampão. Sempre após a extração de 400 glândulas, a amostra foi imediatamente centrifugada a 20.000 RCF por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Centrifuge 5430 R – Eppendorf, Alemanha).

Foram obtidos 29 mg/ml de concentração final de proteínas totais de extrato de glândula de *P. paulista*. Esse processo foi realizado na UEPG, campus Uvaranas, em Ponta Grossa-PR.

Para o transporte até o INFAR, as amostras foram envoltas em papel filme e submersas em água no tubo tipo Falcon, congeladas e mantidas em gelo até o seu destino.

4.9.2 Padronizações do processo cromatográfico

A cromatografia por exclusão molecular, também chamada de gel filtração, baseia-se na separação das moléculas a partir de seu tamanho, sendo eluídas em condições isocráticas.

Para o procedimento de cromatografia foi utilizada coluna Phenomenex modelo Yarra 3 μ m Sec-2000 Coluna 300 x 7,8 mm (Phenomenex – Estados Unidos), com funcionamento de abrangência de massa molecular entre 1 a 300 kDa, indicada para purificação e caracterização de biomoléculas. O enriquecimento do extrato da glândula do veneno da *P. paulista* foi realizado em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 acrescido de 100 mM NaCl.

Essa coluna foi acoplada ao cromatógrafo ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences – Estados Unidos), previamente ambientada no mesmo tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 acrescido de 100 mM NaCl para os padrões e extrato da glândula de veneno.

Os cromatogramas foram realizados sob condições isocráticas e realizada com um fluxo constante inicial de 1 ml/min para os padrões e de 0,25 ml/minuto para a eluição das proteínas do extrato de glândula de veneno da *P. paulista*. A absorbância das frações das proteínas do extrato de glândulas foi monitorada em 280 nm. Para a calibração, preparou-se uma solução com 3 mg/ml dos padrões aldolase, BSA, quimotripsinogenio e ribonuclease. Dessa forma, 100 μ L do tampão foi previamente injetado em um Loop de 100 μ L com o auxílio de uma seringa Microlitem (Hamilton, Estados Unidos) e 150 μ L da mistura de padrões foi aplicada ao Loop em um fluxo 1ml/min.

Todas as etapas cromatográficas foram monitoradas através de cromatogramas utilizando o sistema de software Unicorn 7.0 (GE Healthcare Life Sciences- Estados Unidos).

4.9.3 Cromatografia do extrato de glândula de veneno de *P. paulista*

Aproximadamente 12,5mg de extrato de glândula da *P. paulista* foi aplicado ao Loop acoplado ao cromatógrafo em um fluxo de 0,25 ml/minuto. Em todo o processo, o tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 acrescido 100mM NaCl (Fase móvel) foi mantido em banho de gelo, e cada uma das frações foram direcionadas para o coletor de frações.

No coletor de frações, antes de iniciar o cromatograma, foram identificados os microtubos, e imediatamente após a coleta, as frações foram fechadas e mantidas em gelo. Ao término, foram colocadas em saco plástico identificado e congeladas.

4.9.4 Identificação da presença de inibidores de protease nas frações cromatográficas

A identificação das frações cromatográficas iniciou-se através do rastreamento das amostras por SDS-PAGE gradiente Step. Para tanto, foram preparados no mesmo momento 4 géis (5% a 20%) de poliacrilamida, todos preparados do mesmo modo que o item 4.8.1.

O H_2O foi variou de acordo com a concentração desejada. Utilizou-se Short Plates de 1,5 mm (Mini-PROTEAN®- BioRad – Estados Unidos).

Para o preparo das frações, utilizou-se 40 μ l da eluição e 10 μ l do tampão de amostra não redutor. A corrida eletroforética foi realizado sob corrente constante 60 mA e refrigeração (temperatura aproximada de 4°C a 8°C). Após a corrida eletroforética, os géis de poliacrilamida foram separados e mantidos em solução fixadora (Metanol, ácido acético, formaldeído e H_2O_{pura}); após duas horas, foram corados pelo método de coloração monocromática de prata.

A identificação da presença dos inibidores de protease com atividade nas frações cromatográficas foi analisada por zimografia reversa em SDS-PAGE concentração gradiente step (5-20% copolimerizada com gelatina 1%. Neste experimento, somente as frações que foram reveladas pelo método de coloração monocromática de prata foram utilizadas, sendo incubadas com tripsina 1 mg/ml seguindo o item 4.8.2.1. Optou-se por realizar a corrida da zimografia reversa em duplicata para avaliar a atividade inibitória em tempos diferentes: 2 e 12 horas.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA PRESENÇA DO INIBIDOR DE PROTEASE USANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE EXTRATO DE GLÂNDULA DE VENENO DE *P. PAULISTA*

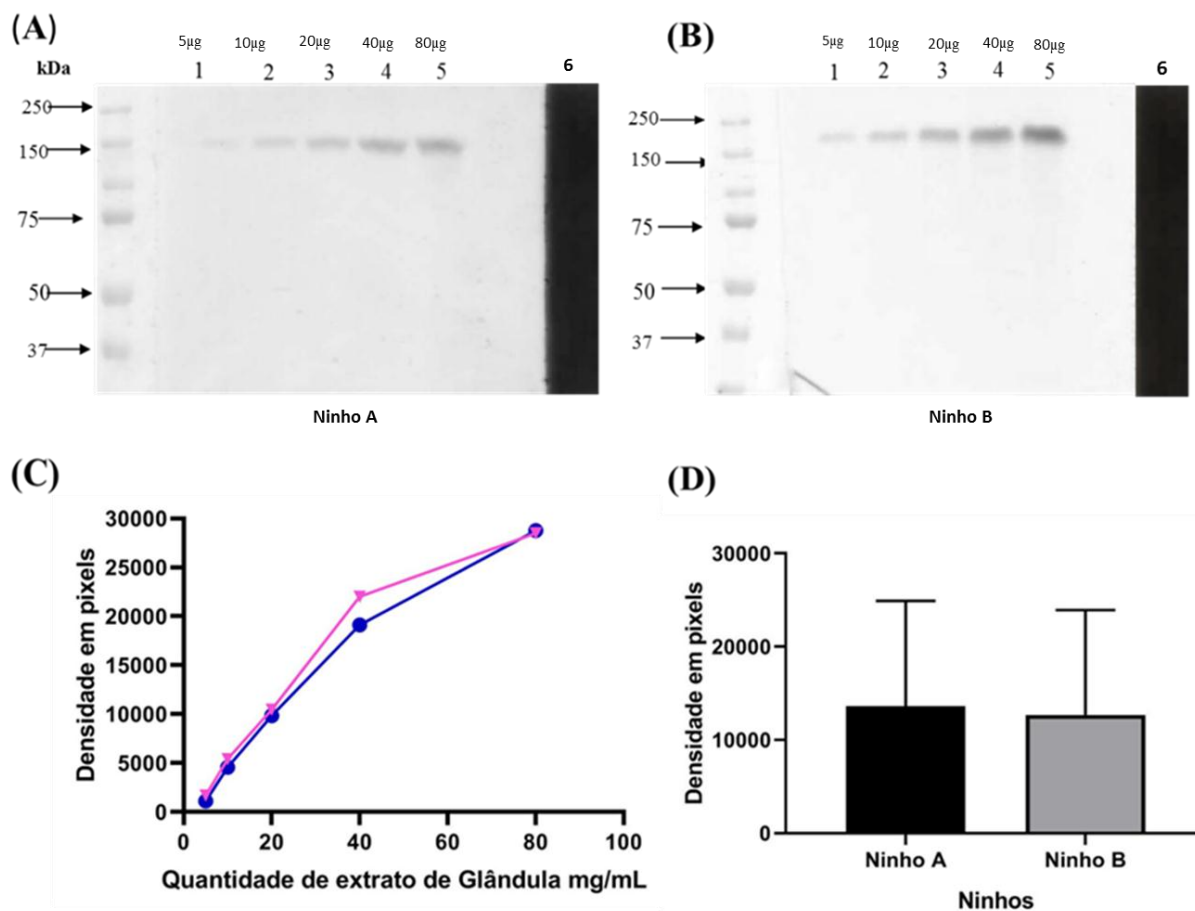
A concentração de proteínas totais de cada uma das dez frações obtidas (fração correspondente a glândulas de 400 vespas de um mesmo ninho) foi obtida pelo método de Bradford, tendo como média de concentração 4,66 mg/ml.

A análise da presença de inibidor de protease no extrato de glândula de veneno foi realizada por zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5 % copolimerizado com 1% de gelatina. Diferentes quantidades do extrato de glândulas de veneno foram submetidas à separação eletroforética e, após a separação, o gel foi incubado com a enzima tripsina (1mg/ml). A Figura 5 apresenta o ninho A e B, respectivamente. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 retratam, respectivamente, as quantidades de amostras com 5,10, 20, 40 e 80µg do extrato de glândulas de veneno obtidas de uma fração com 400 vespas, e 6 representa a linha onde não foi incubado com a enzima tripsina

Na Figura 5, pode-se visualizar a presença de uma banda de aproximadamente 150 kDa, cuja intensidade aumenta conforme a quantidade de proteína total aplicada ao gel, indicando que a presença de inibidores de tripsina é diretamente proporcional a quantidade de proteína total aplicada. Na última linha do gel (6 – controle negativo), pode-se verificar a presença de grande quantidade de gelatina 1% copolimerizada ao gel. Nas outras linhas, se observa que a gelatina foi degradada pela tripsina, exceto onde havia inibidores. Resultados semelhantes são observados na Figura 5B, que representa o Ninho B, onde se pode visualizar também a presença do inibidor de protease na altura entre 150 kDa e 250 kDa.

É pertinente destacar que os ninhos foram coletados em dois momentos diferentes. O ninho A foi coletado durante o verão e o ninho B, durante o inverno. Em ambos os ninhos é possível observar a presença de inibidores com a mesma migração eletroforética aparente. Na Figura 5C observa-se que quanto maior a concentração de extrato de glândulas aplicado ao gel, maior também foi a densidade de pixels formados em cada banda. Verificou-se também que entre os ninhos A e B as densidades das bandas não apresentaram variações significativas (Figura 5D).

Figura 5: Análise da presença do inibidor de protease presente em glândula de veneno de *P. paulista*



Análise feita em SDS-PAGE (8.5%) copolimerizado com gelatina 1% usando diferentes quantidades de extrato, do ninho A e ninho B. (A) e (B) Zimografia reversa das amostras do ninho A e B. A linha 6 se refere ao controle negativo (ausência de enzima) (C) Gráfico correlacionando a quantidade de extrato de glândula com as densidades em pixels obtidas pelo programa ImageJ 5.0; ninho A e ninho B. (D) Correlação entre todos os pontos do Ninho A e B. Utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias em GraphPad Prism versão 8.0. Fonte: Os autores.

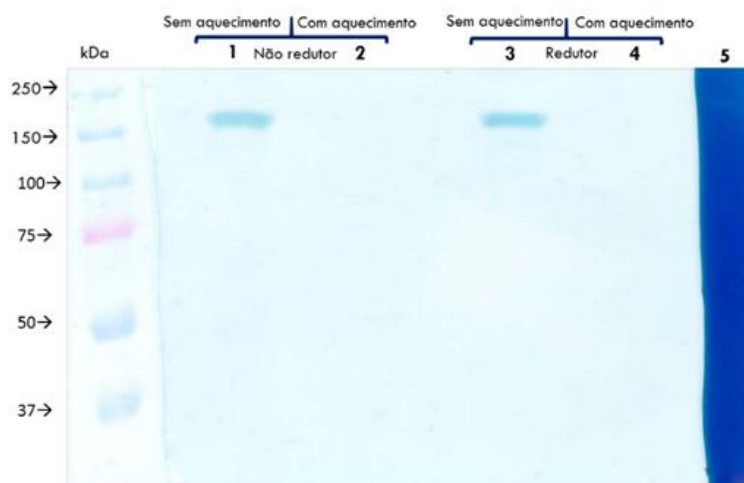
5.2 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO B-MERCAPTOETANOL EM TEMPERATURA

Para avaliar a influência da temperatura e da presença de pontes dissulfeto na atividade do inibidor de protease observado no extrato de glândula de veneno, foi realizada zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5% copolimerizado com gelatina 1% e incubado com tripsina 1 mg/ml. Amostras de extrato de glândula de veneno foram preparadas com tampão de amostra não redutor (linhas 1 e 2) e com tampão de amostra redutor (linhas 3 e 4). As linhas 2 e 4 são amostras aquecidas a 100°C por 10 minutos, enquanto as linhas 1 e 3 são amostras não aquecidas.

De acordo com a Figura 4, é possível observar que amostras aquecidas a 100°C (2 e 4) não apresentaram atividade quando comparadas com as amostras que não foram aquecidas (linhas 1 e 3). Com relação à presença do agente redutor no tampão de amostra, não houve

diferença na atividade do inibidor de protease nas amostras. Verifica-se na linha 5 a gelatina copolimerizada (controle negativo, sem enzima), enquanto no restante do gel, verifica-se a alta atividade enzimática da tripsina degradando completamente o conteúdo protéico, preservando apenas as bandas ao qual o inibidor está presente.

Figura 6: Avaliação do efeito das condições redutoras (β -mercaptoenol) e do aquecimento sobre a atividade proteolítica do extrato de glândula de veneno de *P. paulista*



Zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5% copolimerizado com gelatina 1%. A linha 5 se refere ao controle negativo (ausência de enzima). Fonte: Os autores.

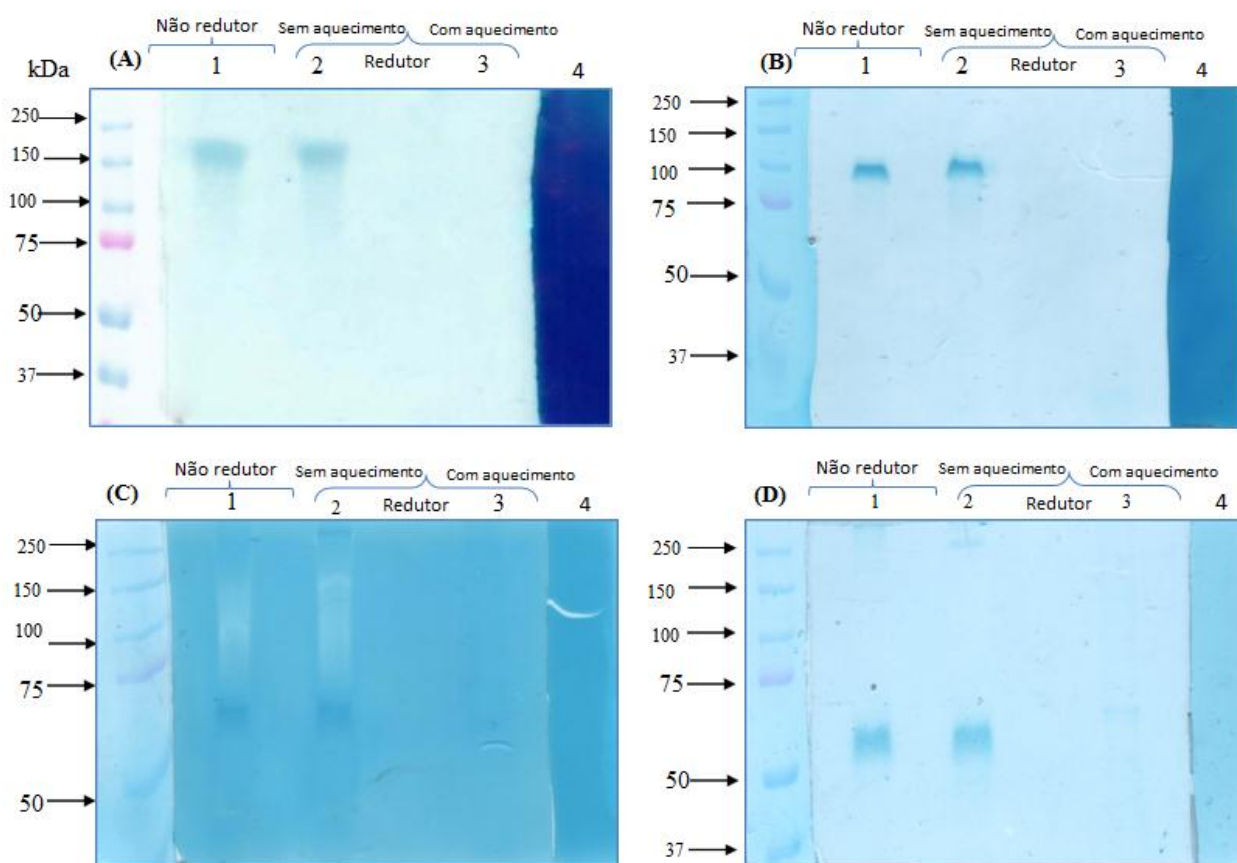
5.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM TRIPSINA

Nesta análise foi utilizada a enzima tripsina, pertencente à classe das serino proteases, assim como os substratos gelatina (Figura 7A), caseína (Figura 7B), BSA (Figura 7C) e ovoalbumina (Figura 7D).

Na Figura 7^a, pode-se observar nas linhas 1 e 2 a presença de uma banda entre 150 kDa e 250 kDa não hidrolisada, indicando a presença de inibidor que inativou a tripsina. Já a linha 3, cuja amostra foi submetida ao aquecimento por 10 minutos a 100°C, não revelou nenhuma banda, indicando a perda de atividade inibitória com o aquecimento. Na Figura 7B verifica-se a presença de banda com aproximadamente 100 kDa, massa molecular diferente da banda observada com o substrato gelatina. O inibidor observado com o substrato caseína também não teve seu efeito alterado na presença do agente redutor (linha 2) e foi sensível à temperatura (linha 3).

Porém, quando se analisa a Figura 7C, cujo gel foi copolimerizado com BSA e a Figura 7D, copolimerizado com o substrato ovoalbumina, é possível observar nas linhas 1 e 2 a presença de inibidores de protease com migração eletroforética aparente entre 50kDa e 75 kDa. Em todos os géis o item 4 representa a quantidade de substrato copolimerizado ao gel sem degradação da enzima tripsina, representa o controle negativo.

Figura 7: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de *P. polybia* sobre a tripsina



Zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5% copolimerizado com gelatina (A); caseína (B); BSA (C) e ovoalbumina (D). A linha 4 se refere ao controle negativo (ausência de enzima). Fonte: Os autores.

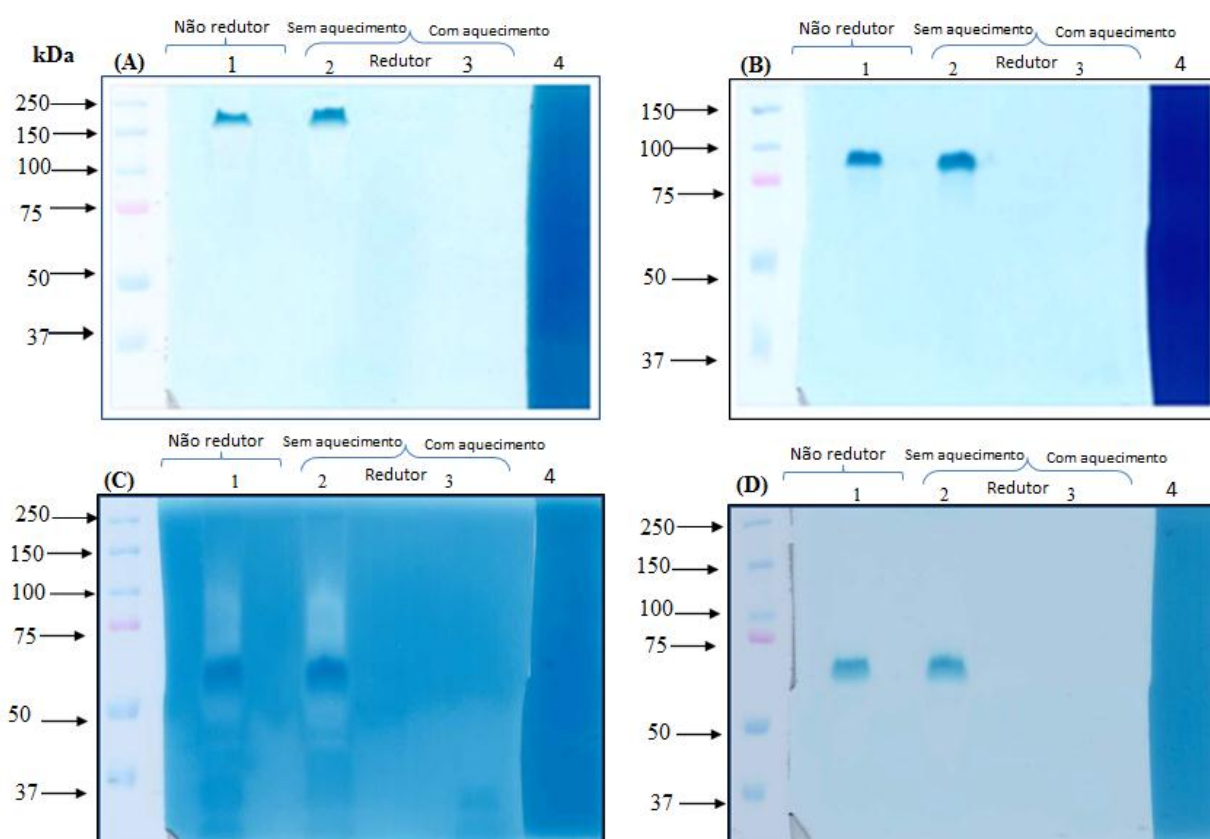
5.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM PAPAÍNA

Nesta análise (Figura 8) foi utilizada a enzima papaína pertencente à classe cisteíno protease. Para isso, diferentes substratos foram copolimerizados em SDS-PAGE através da técnica de zimografia reversa. Na Figura 8A, através do uso de substrato gelatina, pode-se observar banda referente às amostras 1 (não redutora) e 2 (redutora sem aquecimento), as quais impediram o consumo do substrato pela enzima papaína. Ambos possuem migração eletroforética aparente entre 150 e 250 kDa. Na Figura 8B, utilizando-se o substrato caseína, pode-se verificar a inativação enzimática entre 75 e 100 kDa, indicando possivelmente outro

inibidor com migração eletroforética diferente ao encontrado na gelatina. Na Figura 7C e 7D, com substrato BSA e ovoalbumina, respectivamente, verifica-se nas amostras 1 e 2 a presença de inibidores com massa molecular aparente entre 50 e 75 kDa.

Na amostra 3, destacada em todos os géis, visualiza-se que o inibidor perdeu a atividade com o aquecimento.

Figura 8: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de *P. polybia* sobre a papaína



Através de zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5% copolimerizado com gelatina (A); caseína (B); BSA (C) e ovoalbumina (D). A linha 4 se refere ao controle negativo (ausência de enzima). Fonte: Os autores.

5.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM α -QUIMOTRIPSINA

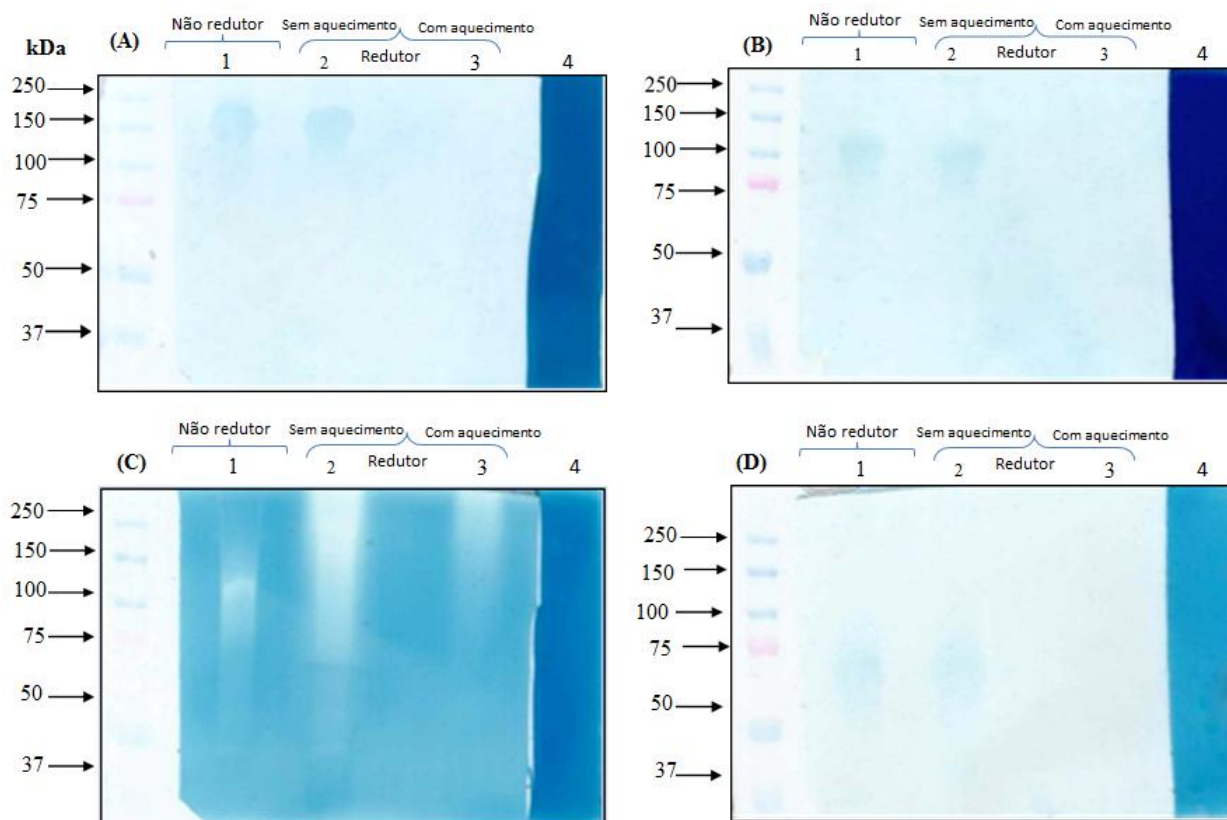
Neste experimento (Figura 9) utilizou-se a enzima α -quimotripsina pertencente à classe das serino peptidases. Aqui, utilizou-se 10mM CaCl_2 para manter as condições ótimas da atividade enzimática.

Dessa forma, pode-se verificar que nas amostras 1 e 2 da Figura 9A (gelatina) a presença de inibição enzimática, ambas com mesma migração eletroforética aparente entre 150 e 250 kDa. Visualiza-se na amostra 3 a completa perda de atividade do inibidor quando aquecido a 100°C. Na Figura 9B, verifica-se a presença de inibidores de serino nas amostras 1 e 2, ambos

com migração eletroforética entre 100 e 150 kDa; na amostra 3, vê-se uma completa perda de atividade com aquecimento.

Analizando a Figura 9C, observa-se um arraste de proteases nas amostras 1, 2 e 3, diferentemente dos resultados encontrados com as outras enzimas proteolíticas, tripsina e papaína, nesta não é possível visualizar a presença de inibidores no substrato BSA. No entanto, na Figura 9D, visualiza-se um arraste de inibição nas amostras 1 e 2 entre 50 e 75 kDa.

Figura 9: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de *P. polybia* sobre a α -quimotripsina



Zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5% copolimerizado com gelatina (A); caseína (B); BSA (C) e ovoalbumina (D). A linha 4 se refere ao controle negativo (ausência de enzima). Fonte: Os autores.

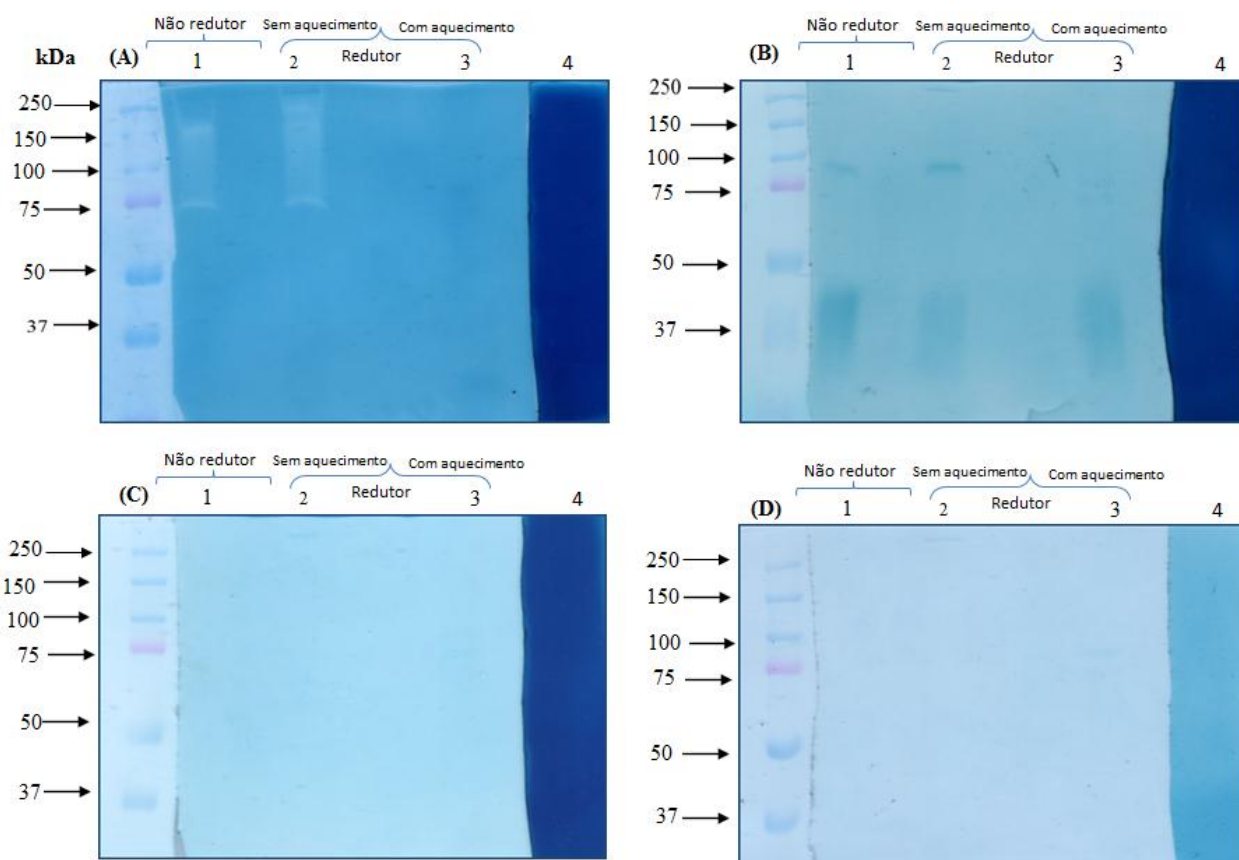
5.6 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM PEPSINA

Neste experimento, utilizou-se a enzima pepsina, pertencente à família das proteases aspárticas. A enzima pepsina precisa de um tampão ótimo com faixa de tamponamento entre o pH 2; assim foi possível avaliar a capacidade de inativação enzimática pelo inibidor de protease presente no extrato de glândula de veneno influenciada pelo pH.

Na Figura 10A (gelatina), observa-se na linha 1 (amostra em condições não redutoras) bandas claras contra um fundo escuro indicando a presença de proteases com aproximadamente

75 kDa e 150 kDa. E também na amostra 2 (redutor sem aquecimento) pode -se observar a presença de bandas de proteases na mesma faixa de migração eletroforética que presente na amostra 1. Na Figura 10B (caseína), encontram-se inibidores de protease entre 75 e 100kDa, podendo-se observar o arraste de possível inibição entre 37 e 50 kDa, inclusive com a amostra 3 (redutora com aquecimento). Na Figura 10C, utilizado-se substrato BSA, e Figura 10D, utilizado-se substrato ovoalbumina, não se visualizam atividades inibitórias nessa faixa de tamponamento.

Figura 10: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de *P. polybia* sobre a pepsina



Zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5% copolimerizado com gelatina (A); caseína (B); BSA (C) e ovoalbumina (D). A linha 4 se refere ao controle negativo (ausência de enzima). Fonte: Os autores.

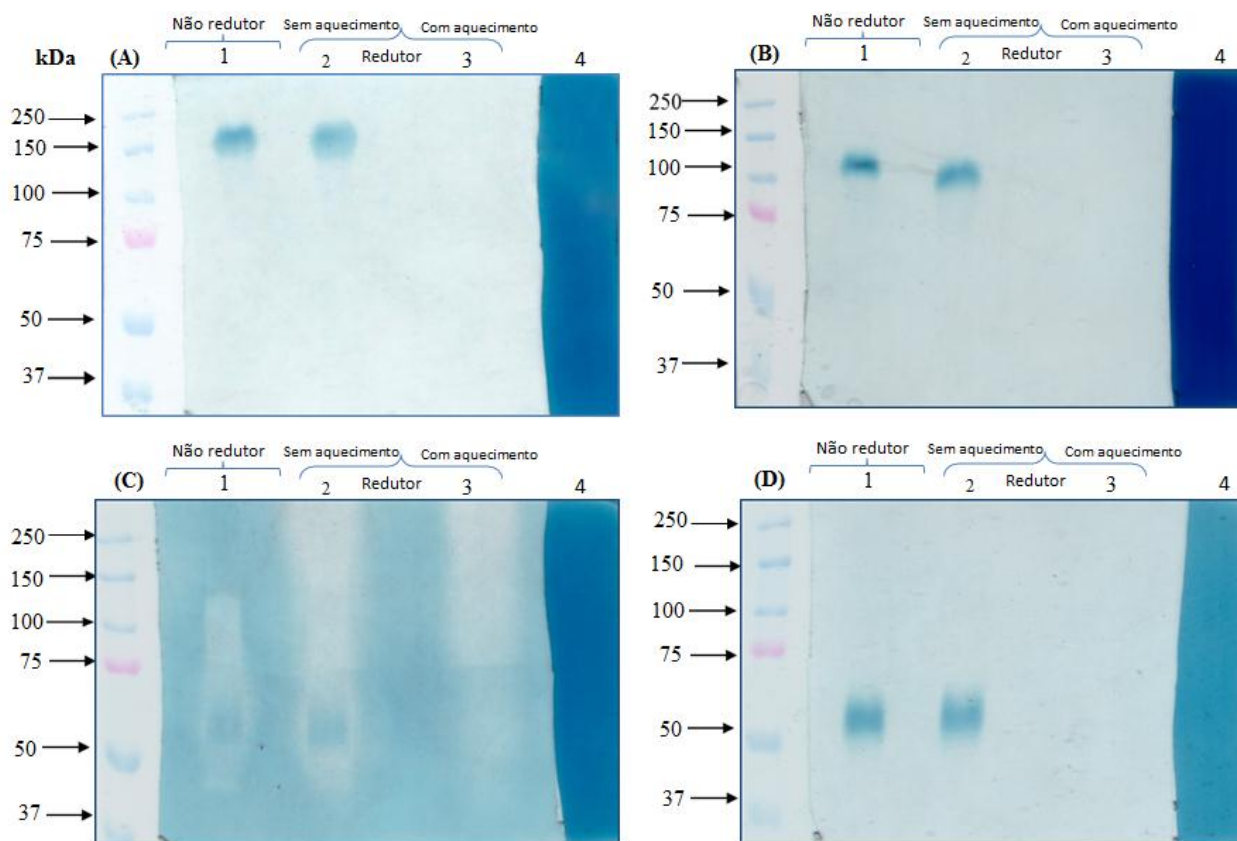
5.7 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDOR DE PROTEASE INCUBADO COM PROTEINASE K

A proteinase K utilizada nesse experimento pertence à classe das serino proteases. Na Figura 11 A (substrato gelatina), verifica-se a inativação enzimática nas amostras 1 e 2, ambas entre 150 e 250 kDa. A amostra 3 exibe que, quando submetida ao aquecimento, perdeu completamente a sua atividade. Na Figura 11B (substrato caseína) observa-se, na amostra 1, a

inibição enzimática entre 100 e 150 kDa e possivelmente uma pequena quebra das ligações dissulfeto. Na amostra 2 (redutor sem aquecimento), verifica-se a inibição próximo a 100 KDa.

No entanto, na Figura 11 C, verifica-se arraste em todas as amostras, mostrando a presença de atividade de proteases. Observa-se nestas a inibição enzimática nas amostras 1 e 2 entre 50 e 75 kDa. Essas inibições também são visualizadas no substrato ovoalbumina representado na Figura 11D. Na última linha do gel representado pelo item 4 verifica-se a quantidade dos substratos contido nos géis; refere-se ao controle negativo e na outra porção do gel, onde foram aplicada as amostras, a alta degradação mantendo apenas as bandas, onde encontram-se o inibidor enzimático contido no extrato de glândula de veneno.

Figura 11: Avaliação do efeito inibitório do extrato de veneno de *P. polybia* sobre a proteinase K



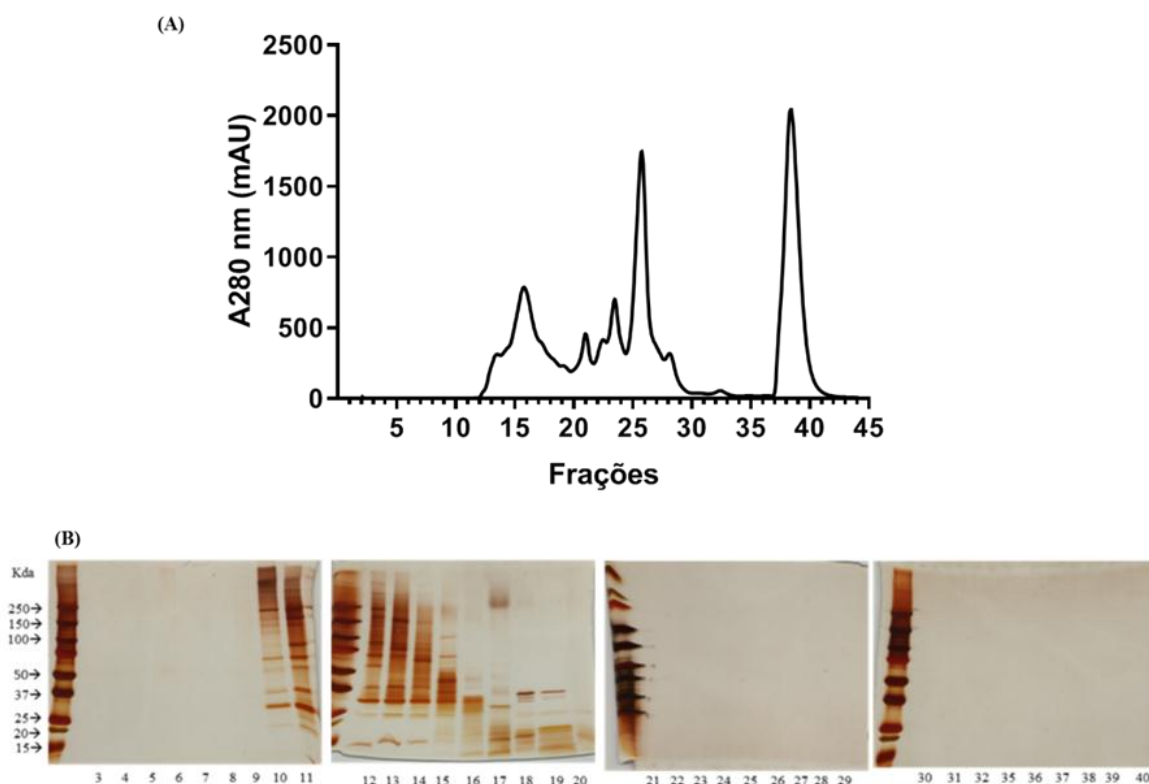
Zimografia reversa em SDS-PAGE 8,5% copolimerizado com gelatina (A); caseína (B); BSA (C) e ovoalbumina (D). A linha 4 se refere ao controle negativo (ausência de enzima). Fonte: Os autores.

5.8 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR

Com o intuito de isolar o inibidor presente no extrato de glândula do veneno da *P. paulista*, foi realizada uma cromatografia por exclusão molecular, também chamada de gel

filtração. No cromatograma, Figura 12A observou-se um aumento da absorbância em 280 nm a partir da fração 12. Estas absorbâncias mantiveram-se elevadas até a fração 32. Observa-se nova absorbância entre as frações 37 e 42. Desse modo, para avaliar o perfil proteico nas frações cromatográficas, utilizaram-se gradientes de concentração de SDS-PAGE diferentes (20%-5%) e foram corados pela coloração monocromática de prata. Abaixo do gráfico, Figura 12B observa-se os quatro géis, todos com o padrão de massa molecular na primeira linha. No restante, encontram-se as frações correspondentes. Observa-se uma ampla variação de massa molecular a partir da fração 10, mantendo-se de forma decrescente até a fração 20. Com esta análise foi possível verificar que a maior parte das proteínas que compõem o extrato de glândula de veneno da *P. paulista* possuem massa molecular na faixa entre 250 e 15 kDa. Entretanto, a maioria das proteínas possuem massa molecular menor que 100kDa; portanto esperava-se, assim, visualizá-las no terceiro gel, pois as absorbâncias das frações 21 a 29 são observadas no cromatograma conforme o gráfico.

Figura 12: Cromatografia por exclusão molecular

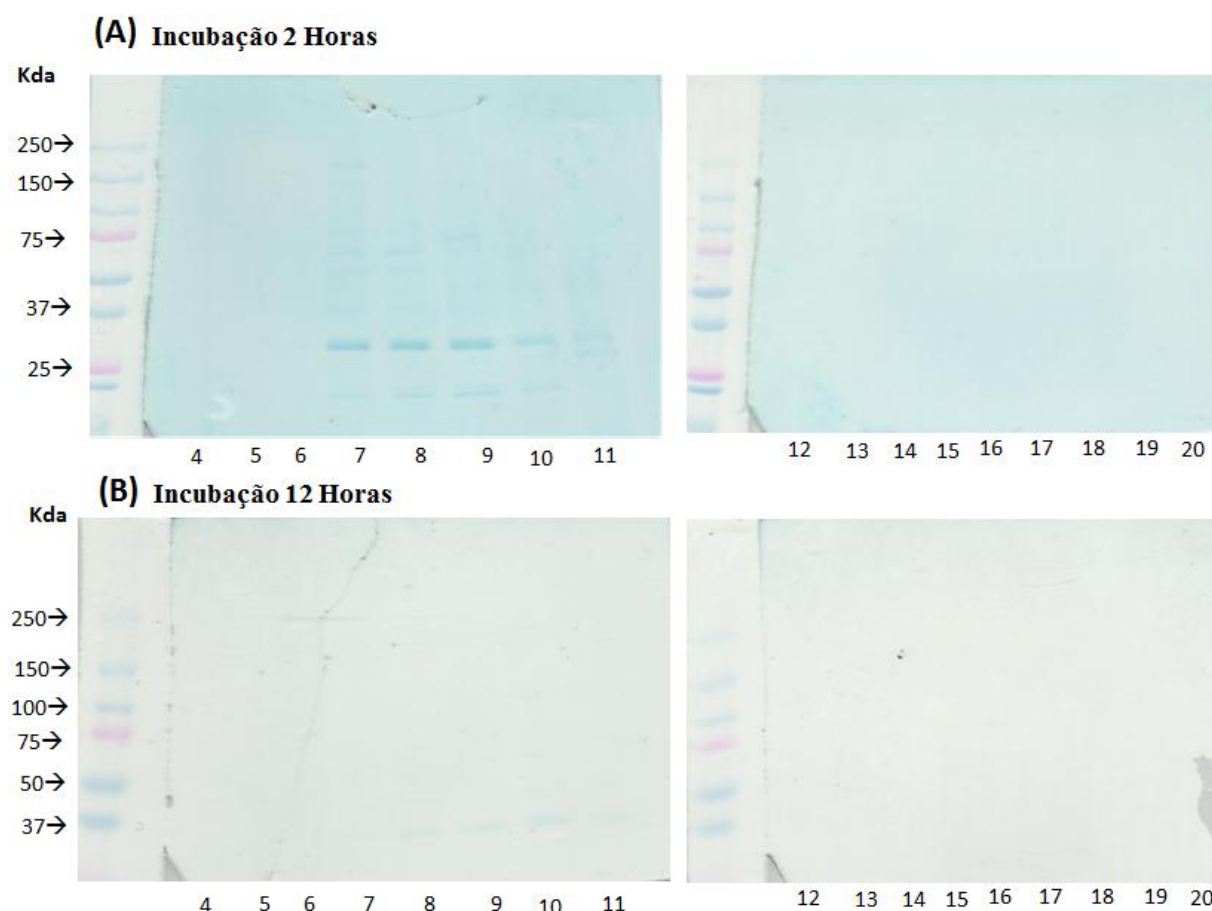


Cromatografia por exclusão molecular com coluna Phenomenex Yarra 3 μ m Sec-2000(A). (B)- SDS-PAGE Step (20-5%) proteínas reveladas com coloração monocromática de prata. Fonte: Os autores.

5.9 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS EM TEMPOS DIFERENTES

A atividade inibitória foi analisada por zimografia reversa em SDS-PAGE com gradiente step (20-5%) copolimerizada com gelatina 1%, sendo utilizadas as frações 4 a 11 no primeiro gel e frações 12 a 20 no segundo gel. Os géis foram incubados com 1mg/ml de tripsina em diferentes tempos. Na Figura 13A, visualiza-se a zimografia reversa incubada por duas horas. Nela, pode-se observar a presença de inibidores de protease entre 37 e 25 kDa entre as frações 7 e 11. Porém, entre as frações 12 e 20, não se visualiza nenhuma inibição. Na Figura 13B, incubada com tripsina por 12 horas, observa-se a alta degradação do substrato e traços de inibidores com massa molecular de 25 a 37 kDa entre as frações 8 e 11. Esperava-se a presença de inibidores de protease com uma massa molecular maior conforme os experimentos com a enzima tripsina demonstrados no item 5.3. Realizou-se as dosagens de proteínas de cada fração cromatográfica pelo método de Bradford, obtendo-se concentrações muitas baixas na ordem de 0,001mg/ml.

Figura 13: Atividade inibitória das frações purificadas



(A) O gel gradiente copolimerizado com 1% de gelatina Incubadas a 37°C com 1mg/mL tripsina em TRIS-HCl 50mM pH 7, por duas horas. Após foram corados por Coomassie Blue G-250. (B) Procedeu-se de a mesma forma porem foram incubados por 12 horas. Fonte: Os autores

6 DISCUSSÃO

A técnica utilizada durante a pesquisa foi baseada no método de zimografia reversa copolimerizada em diferentes substratos descrito por Granelli-Piperno e colaboradores (1978), que consiste em um procedimento eletroforético que permite a visualização do número e tamanho aproximado de enzimas com base na degradação de um substrato copolimerizado juntamente com os géis de eletroforese, é uma técnica bem estabelecida e interessante por ser de simples aplicação (KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1994).

Assim, foi possível identificar no extrato de glândula de veneno da *P. paulista* a presença de inibidor com aproximadamente 150 kDa que inativou a enzima tripsina. Esse inibidor foi observado nas amostras de extrato de glândula de veneno tanto nos animais do ninho coletado em janeiro, quanto no coletado em agosto. Estudos revelam que alguns animais podem sintetizar o veneno a partir de precursores dos elementos químicos do ambiente através da dieta para compor seu veneno (SAVITZKY et al., 2012). No presente estudo, demonstrou-se a presença do inibidor de protease, e não a variação da composição do veneno.

Em trabalho de comparação entre a composição de veneno de formigas e vespas realizado por Mendonça (2014), ambas pertencentes à ordem Hymenoptera, observa-se diferenças claras de composição de seus venenos, mesmo entre amostras de um mesmo ambiente. A autora sugeriu que o componente genético parece ser preponderante para determinar compostos encontrados em uma e outra espécie (MENDONÇA, 2014).

Poucos estudos demonstram possíveis variações na composição das proteínas e peptídeo presentes no veneno de *P. paulista* em relação aos fatores ambientais. Castro e Palma (2009) relataram que as fundações de novos ninhos ocorrem o ano todo. Nesse estudo, foi identificada a presença de inibidores de protease independente aos fatores ambientais, como a alteração climática.

Alguns fatores podem influenciar a atividade dos inibidores de protease, como pH, temperatura, ligações dissulfeto, sabe-se que as proteases possuem pontes dissulfeto em sua estrutura molecular. No presente trabalho avaliou-se a influência do agente redutor β -mercaptoetanol, no extrato de glândula de veneno. E para isso avaliou-se com aquecimento e sem aquecimento. Quando sem aquecimento, a sua estrutura foi mantida, assim como a amostra não redutora, indicando que o inibidor encontrado não possui domínio estrutural dependente das ligações dissulfeto. Porém, quando aquecidas a 100°C por 10 minutos, as amostras com agente não redutor e redutor perderam completamente as suas atividades. De acordo com os resultados propostos por Steiner (1969), os inibidores de tripsina, quando incubados a 90°C,

são desnaturados irreversivelmente, e quando aquecidos por um curto período a 80°C, podem ser renaturados. Nesse contexto, sugerem-se procedimentos futuros para a avaliação da influência da temperatura nos inibidores de protease. O inibidor encontrado perdeu completamente a sua atividade inibitória a 100°C. Em relação ao agente redutor, sugerindo que o inibidor encontrado no extrato de glândula de veneno não depende das ligações dissulfeto, e sim dos domínios na tríade das serino proteases (aspartato, histidina e serina).

Em relação à identificação e caracterização do veneno de membros da ordem Hymenoptera, os estudos disponíveis destacam, principalmente, serino proteases no processo de envenenamento. Em algumas espécies, são bem elucidadas, enquanto em outras, pouco estudadas (QIU et al., 2013). No trabalho realizado por Choo e colaboradores (2012), os autores identificaram e purificado do veneno de *Bombus ignitus* um inibidor de serino protease pertencente à família Kunitz que são inibidores de tripsina, segundo a classificação de Rawlings (2004). Assim como neste trabalho, utilizando-se a enzima tripsina pertencente a classe das serino proteases com o substrato gelatina, identificou-se uma banda com atividade inibitória sobre a tripsina na amostra não redutora e redutora sem o aquecimento de ambas, próximas a 150 kDa. Da mesma forma, se deu com o substrato caseína, que possui um inibidor de tripsina próximo a 100 kDa, assim como nos outros dois substratos que possuem similaridades de estrutura ovoalbumina extraída da clara do ovo e BSA extraída das proteínas séricas bovinas, ambas com identificação de atividade inibitória sobre a tripsina próximas a 60 kDa.

Para os ensaios com a enzima quimotripsina, foi necessária a adição de íon cálcio, que ativa e estabiliza a enzima quimotripsina. Utilizaram-se os mesmos substratos já mencionados com a enzima tripsina. Identificou-se uma banda com atividade inibitória sobre a α -quimotripsina no substrato gelatina com aproximadamente 150 kDa; no substrato caseína 100 kDa; e, em ovoalbumina e BSA, um inibidor de quimotripsina com migração eletroforética próximos a 60kDa. Observa-se uma menor atividade inibitória sob a α -quimotripsina, sugerindo maior estabilidade da enzima obtida pelo íon cálcio.

Wan (2014) demonstrou na glândula de veneno de abelha *Bombus ignitus* um peptídeo de 8 kDa e um inibidor de serino protease recombinante que foi expresso em células de inseto infectadas com baculovírus que exibiram atividade inibitória contra quimotripsina e proteinase K, mas que não apresentou atividade inibitória sobre a tripsina. Diferentemente da glândula de veneno da abelha, no extrato de glândula da vespa *P. paulista* confirmamos a presença de pelo menos três inibidores sobre a α -quimotripsina, proteinase K e tripsina.

A enzima proteinase K pertence à classe das serino proteases e degrada muitas proteínas no estado nativo, sendo estável em uma ampla faixa de pH (4 -12,5) (porém, a atividade ótima

se mantém próxima ao pH 8,0). Assim como a α -quimotripsina, a proteinase K encontra-se na sua forma inativa como pró-enzima, precisando ser ativada pelo íon cálcio. No entanto, nesse ensaio, identificamos a alta atividade inibitória do inibidor presente no extrato de glândula sobre a proteinase K, confirmando que se trata realmente de inibidores de protease.

Com a enzima papaína pertencente a classe das cisteíno protease, a mesma migração eletroforética foi encontrada em todos os substratos. Dessa forma, verifica-se que os inibidores identificados apresentam domínios serino e cisteíno referentes às classes das enzimas inibidas.

Para a avaliação da atividade dessas moléculas, em função do pH, realizaram-se ensaios de zimografia reversa com pepsina, enzima pertencente à família das proteases aspárticas. Verificou-se que o inibidor de protease não apresentou atividade quando se utilizou o pH ótimo para essa enzima. Porém visualizamos uma protease próximo a 75 kDa, indicando a atividade proteolítica também nesta faixa de tamponamento. Dessa forma, evidencia-se que os inibidores de protease presentes no extrato de glândula necessitam de um pH ótimo para manter a sua atividade entre 7 e 8.

Em estudo proteômico de Dos Santos (2010), identificaram-se inibidores de protease presentes no veneno da *P. paulista*, por meio de eletroforese de duas dimensões (2D) e análise em espectrometria de massa, foi identificado três tipos de inibidores (dois da classe serina e um da classe cisteína). A zimografia reversa confirma esses resultados: foram encontrados inibidores de serino (tripsina, quimotripsina, proteinase K) e cisteíno (papaína). De Santos (2010) sugere que eles devem ter um papel importante na manutenção das proteases do veneno em suas formas nativas durante o armazenamento do veneno, prevenindo autólise extensiva das toxinas de natureza proteica do próprio veneno.

Com o intuito de isolar as proteínas com características de inibidor de protease, presentes no extrato de glândula de veneno, optou-se pela realização da cromatografia por exclusão molecular. A cromatografia promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas a serem separadas entre dois líquidos: a fase móvel presente dentro dos poros da fase estacionária e a fase móvel externa aos poros. A fase estacionária consiste comumente em um polímero de tamanho bem controlado que regula a entrada e saída das moléculas que podem permear parcialmente ou completamente dentro da fase estacionária sem ter qualquer interação com ela (COLLINS, 2011). As moléculas que não têm penetração são excluídas e saem primeiro, agrupadas, enquanto as que penetram completamente saem no volume total da eluição.

Utilizou-se a coluna Yarra Sec 2000 com tamanho de poro 145 Å e monitoramento para a presença de proteínas por absorbância em 280nm. Pode-se observar essa distribuição seletiva de moléculas das frações cromatográficas na zimografia com diferentes concentrações de

poliacrilamida (5-20%). Verifica-se uma mistura de proteínas a partir da fração 10 com alta massa molecular e moléculas menores recolhidas no final do processo cromatográfico.

Para rastrear a presença de inibidores de protease realizou-se uma zimografia reversa gradiente step em SDS-PAGE (5-20%), utilizando-se gelatina como substrato e incubação com tripsina 1mg/ml. De acordo com Souza (et al, 2004) a produção de veneno por parte de alguns organismos é consideravelmente baixa, já que algumas espécies apresentam populações com apenas algumas dezenas de indivíduos, havendo, portanto, uma disponibilidade limitada de material para análise, e consequentemente, a inviabilidade para realização dos estudos.

Devido à baixa concentração de proteínas em cada fração cromatográfica, determinada pelo método de Bradford, o objetivo não foi alcançado. Pressupõe-se que, para alcançá-lo, o uso de métodos diferentes se faz necessários; dentre eles, a liofilização ou a utilização de Amicon® para concentrar as proteínas das frações cromatográficas.

Neste trabalho foi identificado três inibidores de protease serino cisteíno, que corrobora com o trabalho realizado por Dos Santos em (2010). Os inibidores identificados são influenciados pelo aquecimento a 100°C, e por variações de pH. Sugere-se novos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos nos processos patofisiológicos.

7 CONCLUSÃO

- ✓ O inibidor de protease foi identificado por zimografia reversa em ambos os ninhos coletados em 2018, demonstrando que os inibidores estão presentes em diferentes coletas realizadas no decorrer do ano.
- ✓ O β -mercaptoetanol demonstra não interagir com as ligações dissulfeto nos inibidores de protease encontrados no extrato de glândula do veneno de *P. paulista*, o aquecimento a 100°C favorece a perda da atividade dos inibidores.
- ✓ Os inibidores de protease não foram encontrados quando incubado com a enzima pepsina pH 2,0.
- ✓ Foram identificados atividade inibitória do extrato de glândula de veneno sobre as enzimas tripsina, α -quimotripsina e proteinase K. utilizando os substratos gelatina, caseína, BSA e ovoalbumina. Todas pertencentes a classe das serino proteases.
- ✓ Foram identificados atividade inibitória do extrato de glândula de veneno sobre a papaína enzima pertencente a classe das cisteíno protease.
- ✓ Os componentes proteicos presentes no extrato de glândula de veneno foram separados por cromatografia por exclusão molecular, mas não foi possível a detecção da atividade inibitória nas frações, sugere-se o uso de uma coluna de separação com um Range menor que necessite de menor volume de eluente, ou a utilização de outro método complementar para concentrar as proteínas das frações cromatográficas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. M. Utilização de recursos florais por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em uma área de Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.20, 2006, p.457-467.
- ARAI, S.; et al. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v.50, 2002.
- BARRETT, A. J. The Cystatins: A new class of the peptidase inhibitors. **Thends Biochem.** v.12, 1987.
- _____. Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. **Methods Enzymol** v.244, 1994.
- _____. et al. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Elsevier Academic Press, 2004.
- _____. An introduction to the proteinases. **Proteinase Inhibitors**. Elsevier: Amsterdam, 1986, p.3-22.
- BRADFORD, M; MARION, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 1976, p.248-254.
- BREUGELMANS, B., et al. Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**. v.30(3), 2009, p.622-32.
- BRIGATTE, P. et al. Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*). **Amino Acids**, v. 40, 2011, p.101–111.
- BODE, W; ROBERT H. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **EJB Reviews**. Springer Berlin Heidelberg, 1993, p.43-61.
- CASTRO, F. F. M.; PALMA, M. S. **Alergia a venenos de insetos**. Ed. Manole, 2009, p.230.
- CARRILLO, L et al. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, n.10 ,2011, p.1191-1200.
- CHOO Y.M, et al. **Antifibrinolytic Role of a Bee Venom Serine Protease Inhibitor That Acts as a Plasmin Inhibitor**. PLoS ONE, 2012.
- COSTA, J. D. O. et al. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochimie**, v.92, n.12, 2010, p. 1760-1765.
- COLLINS, C.H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica** v.3 (2), 2011, p. 107-114.
- DE CASTRO; SILVA, J. et al. Pathophysiological effects caused by the venom of the social wasp *Synoecca surinama*. **Toxicon**, v.113, 2016, p. 41-48.
- DE SOUZA, B. M. et al. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Rapid communications in mass spectrometry** v. 18, 2004, p. 1095-1102.
- _____. et al. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 30, 2009. p. 1387-1395.
- DE GRAAF, D. C. et al. Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. SUPPL. 1, 2010. p. 11-26.

- DE 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, n. 1, 1998, p. 189-199.
- DIAS, N. B. et al. Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): A comparison of the intra-and inter-colony compositions. **Peptides**, v.51, 2014, p. 122-130.
- DOS SANTOS, L. D. et al. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, v. 9, 2010, p. 3867-3877.
- FITZGERALD, K. T, et al. Hymenoptera stings. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 21, n. 4, 2006, p. 194-204.
- GIANOTTI, A. **Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular**. Florianópolis: UFSC, 2008.
- GOLDEN, D. B. K. Diagnosis and prevalence of stinging insect allergy. **Clinical Reviews in Allergy**, v. 5, n. 2, 1987, p. 119-136.
- GOMES, P. C. et al. Structure-function relationships of the peptide Paulistine: A novel toxin from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Biochemicals et Biophysical**, v.1840, n.1, 2014, p. 170-183.
- GRANELLI-PIPERNO A; REICH, E. A study of proteases and protease inhibitor complexes in biological fluids. **J Exp Med**, 1980.
- HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.431(1), 2004, p.145-159.
- HE N., et al. Genomic structure and expression analysis of the gene encoding a silkworm basic Kunitz-type chymotrypsin inhibitor. **Biochim Biophys Acta**. v.1628(1), 2003, p.71-7.
- HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, 2002, p. 4501-4524.
- IVANOV, D., et al. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. **J. Biol. Chem**. v.281, 2006. p.17246-17252.
- JUSTO, D. L. J., et al. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v. 64, 2013, p. 70-80.
- KLEINER, D. E.; STETLERSTEVENSON, W. G. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases Analytical Biochemistry. **Analytical Biochemistry**, v.218, n.2, 1994, p.325-329.
- KRESS H., et al. **Insect Biochem Mol Biol**. v.34, 2004, p.855-869.
- KOIWA, H; BRESSAN, R.A; HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plants Science**, v.2, n.10, 1997, p.379-384.
- KOLARICH, D., et al. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. Amsterdam: **The FEBS Journal**, v.272, 2005, p.5182-5190.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, 1970, p. 680–685.
- LASKOWSKI, M.J.R.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v.49, 1980, p. 685-693.
- LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D.P. Protease inhibitors: Current status and prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, n.3, 2000, p.305-341.
- MENDONÇA, Angélica. **Análise da variação intra e interespecífica na composição do veneno de Hymenoptera sociais pela técnica FTIR-PAS**. Dourados-MS: UFGD, 2014.
- MARKOVIĆ-HOUSLEY, Z. et al. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. **Structure**, v. 8, n. 10, 2000, p. 1025-1035.
- MACHADO, Vera L.L. Análise populacional de colônias de *Polybia* (*Myrapetra*) paulista (Ihering, 1896) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. Sociedade Brasileira de Zoologia, v.2, n.4, 1983, p.187-201. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/28301>>, acesso 8 jun. 2019.
- MACEDO, M.L.R., et al. Characterization of Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina*. **Phytochemistry**, v. 68, 2007.
- MEDEIROS, F. O. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.45(6), 2003.
- MONTI, R., et al. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, 2000.
- MUKHERJEE, A. K. The pro-coagulant fibrinogenolytic serine protease isoenzymes purified from *Daboia russelii russelii* venom coagulate the blood through factor V activation: Role of glycosylation on enzymatic activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014, p.1-14.
- NAKAJIMA, T., et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, v.25, 1986, p. 115-121.
- NEURATH, H. Evolution of Proteolytic Enzymes. **Science**, v.224, 1983, p.350-357.
- OMS. Incidência de acidentes por animais peçonhentos. **Brasil 2000-2018**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>>, acesso 2 fev. 2009.
- PEREZ-RIVEROL, A., et al. Facing Hymenoptera venom allergy: From natural to recombinant allergens. **Toxins**, v.7, 2015, p.2551-2570.
- QI, R.F.; Song, Z.W.; Chi, C.W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochemical Biophysics**. v.37, p.283-292, 2005.
- QIU, Y. et al. Molecular cloning and antifibrinolytic activity of serine protease inhibitor from bumblebee (*Bombus terrestris*) venom. **Toxicon**, v.63, 2013, p.1-6.
- RAMALHO, L.G.; SASAKI, S.D. **Estudo Sobre Inibidores de Serinoproteases extraídos de Artrópodes**. Disponível em: <http://ic.ufabc.edu.br/II_SIC_UFABC/resumos/paper_5_214.pdf>, acesso 10 jan. 2019.
- RAWLINGS, N.D et al., Famílias evolutivas de inibidores de peptidase, **Biochem**, J. 378, 2004.
- _____; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, v. 290, 1993. p. 205-218.

- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.62, n.3, 1998, p.597-635.
- RICHES, H. R. C. Hypersensitivity to bee venom. **Bee World**, v.63, 1982, p.7-22.
- SANTOS, L. D. et al. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**, v.50, n.7, 2007. p. 923-937.
- SOUZA, M. M. de & J. C. Zanuncio. **Marimbondos: vespas sociais** (Hymenoptera: Vespidae). Editora UFV, v.79, 2012.
- SOUZA, B. M., et al. Strutural and functional characterization of two novel peptide toxins isolad from the venem of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v.26, n.11, 2005.
- SOUZA, B. M., et al. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.18, 2004.
- Steiner, RF, Frattali, VJ, Agr. **Food Chemistry**, v.17, 1969, p.513.
- SAVITZKY, A.H, et al. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. **Chemoecology**, v.22, 2012, p.141-158.
- TEIXEIRA, C. F. P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v.42, n.8, 2003, p.947-962.
- VON ILHERING, H. Zur Biologie Der Socialen Wespen Brasiliens. **Zoologischer Anzeiger**, v.19, 1896, p.449-453.
- YASUHARA T, Nakajima T, Fukuda K, Tsukamoto Y, Mori M, Kitada C, Fujino M. Structure andactivity of chemotactic peptide from the venom of vespinae. **Peptide chemistry**, 1983, p. 185-190.
- WHITFIELD, J. B. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. **Annual review of entomology**, v. 43, 1998. p.129-151.
- ZUPUNSKI, V., Kordis, D., Gubensek,F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. **FEBS Left** v.547, 2003, p.131-136.
- ZHENG QL, Chen J, Nie ZM, Lv ZB, Wang D, Zhang YZ. Expression, purification and characterization of a three domain Kazal-type inhibitor from silkworm pupae (*Bombyx mori*). **Biochem Mol Biol**, v.146(2), 2007, p.234-240.
- WAN, Hu., et al. A bumblebee (*Bombus ignitus*) venom serine protease inhibitor that acts as a microbial serine protease inhibitor. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2014.

Anexo A – Certidão SisGen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº ABFE32F

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **ABFE32F**
 Usuário: **Elisandra Aurélia Duarte**
 CPF/CNPJ: **926.540.459-00**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Impossibilidade de identificação

Polybia paulista

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Identificação e caracterização dos componentes proteicos presentes no extrato da glândula secretora da vespa social Polybia paulista. Ordem Hymenoptera.**

Equipe

Elisandra Aurélia Duarte

UEPG

Data do Cadastro: **29/07/2019 21:39:43**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:23 de 30/10/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo B – Certidão SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 71078-1	Data da Emissão: 04/12/2019 18:34:55	Data da Revalidação*: 04/12/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Elisandra Aurélla Duarte	CPF: 926.540.459-00
Título do Projeto: Venho por Intermediário desta solicitar a coleta, extração e transporte. Da vespa social Polybia paulista, pertencente a ordem Hymenoptera. O objetivo do presente trabalho será identificar e caracterizar inibidores de protease presentes no veneno da vespa. É fundamental investigar as propriedades biológicas e farmacológicas de inibidores de proteases para compreender seus mecanismos em processos patofisiológicos.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	CNPJ: 80.257.355/0001-08

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta, extração, identificação	07/2019	07/2024

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe de necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação de legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes de cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ctgen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0710780120191204

Página 1/3