IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASE EM VENENO DE VESPA *Polybia paulista*

Caroline Gomes Dobrovolski (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Rafael Bertoni da Silveira (Orientador), e-mail: rafaelbertini@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área e subárea do conhecimento CNPq: Ciências Biológicas/Química de macromoléculas.

Palavras-chave: Toxinas, Animais peçonhentos, Inibidor de protease, *Polybia paulista.*

Resumo

O veneno dos insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, que inclui abelhas, vespas e formigas, vem sendo amplamente estudado, mostrando potenciais alergênicos e farmacológicos. Dentre eles está presente a vespa social *Polybia paulista* cujo compostos do veneno, estão Fosfolipases A e B, Hialuronidases, Antígenos 5 e Fosfatases ácidas, proteases e inibidores de protease. Desta forma o objetivo desse trabalho é identificar e caracterizar inibidores de protease no veneno da vespa social *Polybia paulista*. Para identificação da presença de inibidores de protease, foi realizado experimento de Zimografia reversa, com diferentes quantidades do veneno frente a diferentes enzimas proteolíticas e determinação da migração eletroforética aparente. Face aos resultados podemos inferir que em ambos os experimentos de Zimografia reversa, ocorreram o aparecimento de bandas, indicando a presença de inibidor de protease. Frente ao padrão de massa molecular, a migração eletroforética aparente foi de aproximadamente 165kDa, propondo a existência de inibidor(es) de proteases no veneno de *Polybia paulista*, capaz(es) de atuar sobre as classes de diferentes proteases.

Introdução

Ao longo do tempo, muitos estudos focaram em substâncias bioativas presentes em venenos de animais como: cobra, escorpiões, aranhas, abelhas, vespas dentre outros. Os venenos dos insetos da ordem Hymenoptera, que inclui abelhas, vespas e formigas, possuem grandes potenciais alergênicos e farmacológicos. (FITZGERALD; FLOOD, 2006). O veneno da vespa, assim como de outros animais da ordem Hymenoptera, é importante instrumento de defesa individual e da colônia. Uma picada causa sintomas caracterizados por dor, vermelhidão e inchaço local, podendo levar a sintomas clínicos mais graves como edema, fadiga, tontura, febre, náusea e até inconsciência. A principal preocupação é anafilaxia (reação alérgica grave) que, se não tratada a tempo, pode levar a óbito (SANTOS et. Al, 2010).

Muitos estudos descreveram substâncias presentes no veneno com grandes potenciais farmacológicos, microbiológicos, anticonvulsivantes e anticoagulantes, mostrando ser uma grande área de estudo para a descoberta de novas biomoléculas (HOSHINA et al., 2013).

Foi identificado a presença de inibidores de serino – cisteíno proteases e acredita-se que essas proteínas poderiam agir como inibidores de proteases do próprio veneno para evitar a auto proteólise. (SANTOS et. al, 2010). Além disso, os inibidores de serino protease possuem grande importância devido às suas várias funções fisiológicas, como resposta imune, hemostasia, fibrinólise e a eliminação de inflamação (CHOO et al., 2012). De fato, os inibidores de protease possuem funções fisiológicas importantes, sendo portanto o objetivo desse presente estudo a identificação e caracterização bioquímica de tais proteínas presentes no veneno de *P. Paulista*.

Materiais e Métodos

Obtenção das vespas

As vespas foram obtidas na Universidade Estadual de Ponta Grossa. O ninho foi envolvido num saco plástico e colocado no freezer a -20 ºC. Após isto, os animais foram fracionados em potes de plásticos individuais com 400 animais cada e armazenados a -20 ºC.

Extração do Veneno

O extrato da glândula foi obtido através da retirada do aparato inoculador (glândula e ferrão) manualmente com auxílio de uma pinça e mantida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) à 4ºC. Após isto, as glândulas foram pressionadas contra a parede do tubo com auxilio de um bastão. Então o material foi centrifugado a 20.000 RCF por 15 minutos à 4ºC e o sobrenadante foi coletado e congelado à – 20ºC.

Dosagem de proteínas presentes no veneno

A dosagem de proteínas totais foi feita pelo Método de Bradford adaptado para microensaio em 96 poços.

Experimento de Zimografia Reversa com enzimas proteolíticas

Para tripsina, partiu-se de uma concentração inicial do veneno bruto de 2µg/µL e determinadas quantidades totais finais para 10µg, 20µg e 40µg. As quantidades do veneno foram submetidas a uma SDS-PAGE em gel a 7,5%, utilizando gelatina 1% como substrato e a corrida realizada à 4°C sob condições não redutoras. O gel foi lavado em solução de Tween 80 a uma concentração de 2.5% por 30 minutos (2x). Após, o gel foi incubado por um período de 16 a 24horas à temperatura de 37°C em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4 contendo NaCl 150mM na presença de tripsina 1mg/mL. Para papaína partiu-se de uma concentração inicial do veneno bruto de 4,47µg/µL e determinada quantidade total final para 60µg. Essa quantidade do veneno foi submetida a uma SDS-PAGE em gel a 10%, utilizando gelatina 1% como substrato e a corrida realizada a 4°C sob condições redutoras e não redutoras. O gel foi lavado em solução de Tween 80 a uma concentração de 2.5% por 30 minutos (2x). Após, o gel foi incubado por um período de 16 a 24horas à temperatura de 37°C em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4 contendo NaCl 150mM na presença de papaína 1mg/mL. Ambos os géis após incubação foram corados com azul de Coomassie R-250 a 0,25%, por 30 minutos e descorado com solução Metanol 50% sob agitação constante.

Resultados e Discussão

Determinação da presença de inibidores de protease.

Analisando o gel 7,5% incubado na presença de enzima proteolítica tripsina 1mg/ml, conforme apresentado na Figura 1, e gel 10%, incubado na presença de enzima proteolítica papaína 1mg/ml, conforme apresentado na Figura 2, ambos utilizando gelatina 1% como substrato, observa-se bandas azuis do substrato contra o fundo claro, indicando a presença de inibidores de protease.

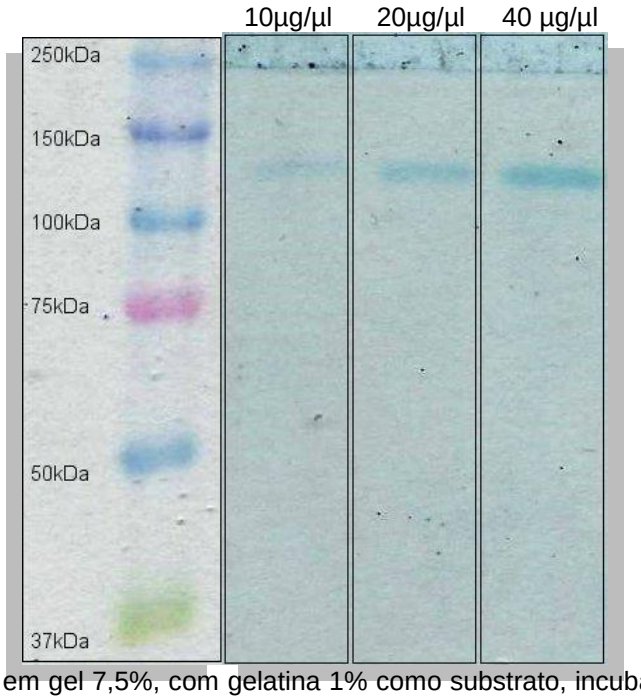


Figura 1 - SDS- PAGE em gel 7,5%, com gelatina 1% como substrato, incubado por 16 a 24horas à temperatura de 37°C em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4 contendo NaCl 150mM na presença de tripsina 1mg/ml. A observação de bandas azuis indica a presença de inibidores de protease.

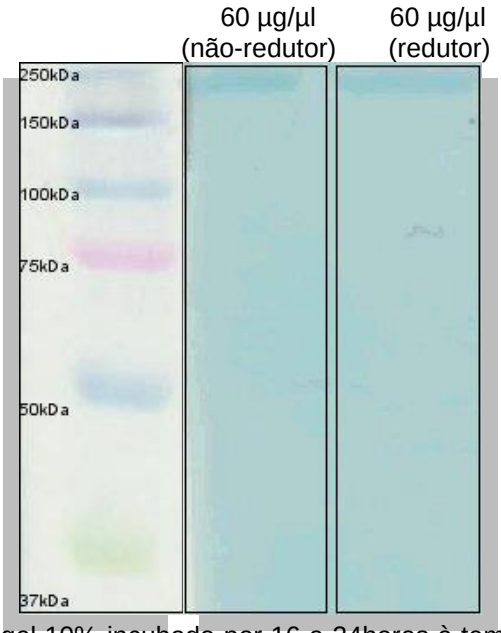


Figura 2 - SDS- PAGE em gel 10% incubado por 16 a 24horas à temperatura de 37°C em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4 contendo NaCl 150mM na presença de papaína 1mg/ml, em condições não redutoras e redutoras sem aquecimento. A observação de bandas azuis indica a presença de inibidores de protease.

Na determinação da migração eletroforética aparente no gel 7,5%, frente à tripsina 1mg/ml, foi calculado uma massa molecular de aproximadamente 165kDa. Em alguns estudos foram encontrados inibidores de serino protease de duas espécies diferentes de vespas (PARKINSON et al., 2004; HISADA et al., 2005). Em outro foi identificado um novo inibidor de serino protease denominado Bicolin, no veneno da vespa *Vespa bicolor* Fabricius (YANG et al., 2009). Em outro estudo pesquisadores mostraram a presença de inibidores de serino – cisteíno protease no veneno da vespa *Polybia paulista* (SANTOS et. Al, 2010).

Conclusões

O veneno da vespa social *Polybia paulista* possui muitos componentes e dentre eles se encontram os inibidores de protease, com massa molecular de aproximadamente 165kDa. São ainda poucos compreendidos em suas funções, sugestões que precisariam ser respondidas e elucidadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem Universidade Estadual de Ponta Grossa pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e pelo suporte de pesquisa.

Referências

FITZGERALD, Kevin T.; FLOOD, Aryn A.. Hymenoptera Stings. **Clinical Techniques In Small Animal Practice**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.194-204, nov. 2006. Elsevier BV.

SANTOS, Lucilene Delazari dos et al. Profiling the Proteome of the Venom from the Social WaspPolybia paulista: A Clue to Understand the Envenoming Mechanism. **Journal Of Proteome Research**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.3867-3877, 6 ago. 2010. American Chemical Society (ACS).

HOSHINA, Márcia M. et al. Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp Polybia paulista. **Toxicon**, [s.l.], v. 72, p.64-70, set. 2013. Elsevier BV.

CHOO, Young Moo et al. Antifibrinolytic Role of a Bee Venom Serine Protease Inhibitor That Acts as a Plasmin Inhibitor. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.32269-32269, 16 fev. 2012. Public Library of Science (PLoS).

HISADA, Miki et al. Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, Anoplius samariensis. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 330, n. 4, p.1048-1054, maio 2005. Elsevier BV.

PARKINSON, Neil M et al. Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp Pimpla hypochondriaca. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.565-571, jun. 2004. Elsevier BV.

YANG, Xinbo et al. A novel serine protease inhibitor from the venom of Vespa bicolor Fabricius. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B**: Biochemistry and Molecular Biology, [s.l.], v. 153, n. 1, p.116-120, maio 2009. Elsevier BV