
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE cDNA
DA ENZIMA HIALURONIDASE DO VENENO DE
Polybia paulista (HYMENOPTERA: VESPIDAE)**

GISELLY PEREIRA DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro - 2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE cDNA
DA ENZIMA HIALURONIDASE DO VENENO DE
Polybia paulista (HYMENOPTERA: VESPIDAE)**

GISELLY PEREIRA DA SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto-Braga

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

*Ao meu pai, que nos deixou a tão pouco da realização deste trabalho... Por todo amor
e todo apoio... Sempre...
Dedico.*

À minha mãe, que esteve sempre comigo, iluminando o meu caminho para que eu o trilhasse sem medo e com muita esperança. À você que se deu por inteira e que muitas vezes renunciou aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus...

Ao meu eterno companheiro Edson, pelo seu amor, pelo seu carinho e acima de tudo por estar comigo em todos os momentos...

Amo vocês!

Ofereço.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos

antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo uma escada...

Do sonho uma ponte...

Da procura um encontro...”

Fernando Pessoa.

*“Quando a vida realiza alguma mudança,
mesmo que não possamos entender o porquê,
sempre é para melhor.*

*Ainda que nos traga dor,
sempre haverá outras compensações,
outros caminhos de renovação
com maiores chances de felicidade”.*

Espírito Lucius.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora e amiga Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto-Braga, por tudo que me ensinou e principalmente pela amizade e confiança que sempre me dedicou. Você conquistou toda minha estima e admiração. Agradeço de forma muito especial por me orientar e lutar comigo para que conseguíssemos chegar até aqui...

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira e ao Prof. Dr. Vadim Viviani pelas valiosas discussões sobre o trabalho.

A todos os docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro por estarem sempre dispostos ao esclarecimento de dúvidas e pelo carinho que sempre me transmitiram, em especial ao Prof. José Chaud Netto pela confiança e amizade que sempre me dedicou.

Ao técnico Sérgio pelo auxílio prestado nas coletas dos ninhos de vespas e pela amizade.

Ao grande amigo e técnico do Laboratório de Biologia Molecular, Anderson Rodrigues pela orientação, pelo auxílio prestado, pelo apoio e principalmente pelos valiosos conselhos, carinho e amizade com que sempre me recebeu.

Ao pessoal do Departamento de Biologia pela amizade e pelo auxílio prestado: Rogilene, Lucila, Cristiane, Neusa e Gérson.

A todos os funcionários da Biblioteca e Secção de Pós-Graduação pela ajuda concedida.

A todos os meus amigos de pós-graduação e de orientação, companheiros de todas as horas, pela grande amizade construída durante todos estes anos, e por terem compartilhado comigo muitos momentos: Daniela, Sandra, Lorena, Patrícia, Giovana, Karim, Débora, Iracema, Thaís, Bruna, Thaísa e em especial ao Fred, que muitas vezes saciou minhas dúvidas e ao Antônio por ter me oferecido além da sua amizade e presteza, seus conhecimentos, que foram muito importantes na concretização deste trabalho, a vocês meu eterno agradecimento!

Às minhas queridas amigas Gabriela, Gislaine e Fernanda, por todos os momentos de alegria que passamos juntas, por toda força e carinho que encontrei em vocês nos momentos mais difíceis da minha vida, enfim por todo amor que sempre me dedicaram... Vocês foram essenciais na realização deste trabalho...

À minha eterna companheira de laboratório Cintia, por todos os momentos vividos, pelos conselhos e principalmente pelo carinho que você sempre me dedicou, grande parte deste trabalho também foi possível graças à você que sempre me deu forças para que eu continuasse, sinto muito sua falta....

Às minhas amigas Aline e Priscila que mesmo distantes continuam demonstrando preocupação e um grande carinho pela nossa amizade.

Ao meu pai, João Demétrio Procópio da Silva, que acreditou no meu trabalho, me apoiou e permitiu que eu chegasse até aqui. Embora tenha nos deixado a tão pouco do término deste trabalho, tenho certeza que você estará presente em todos os momentos da minha vida. Dedico meu amor eterno!

À minha mãe Elisabete Cássia Pereira da Silva, pelo seu carinho, apoio, e compreensão, mas principalmente por pensar e agir por mim nos momentos de desespero, e por estar comigo em todos os momentos...Amo você mãe!

Ao meu amor Edson, uma pessoa que viu o melhor que havia em mim e me ajudou a encontrar a mim mesma....Por todo amor que encontrei em você, por toda a alegria que trouxe à minha vida, por todas as vezes que permaneceu ao meu lado, por me levantar quando eu não conseguia alcançar e principalmente por me fazer acreditar que podia ir muito mais longe quando achava que já não podia mais, pelo apoio que me traz segurança, pelo carinho...TE AMO!

Aos amores de minha vida, meus cães Joy e Califa, que enchem em minha vida de alegria e de um amor incondicional!

À uma amiga muito especial que está ao meu lado há muitos anos, Layla Schmidt, por me ensinar a amar os momentos simples da vida, por estar ao meu lado com todos os meus defeitos e qualidades, mas principalmente pelo apoio, compreensão e carinho, prestados nos momentos que mais precisei, e por todas as risadas e lágrimas. Adoro você!

Às amigas Ester, Samira e Mariana, pela amizade e por todos os momentos que passamos juntas, por me entenderem e me ajudarem em todos os momentos, vocês são muito especiais para mim...

Às minhas tias Eliana e Eliane por todo o carinho, por me apoiarem em todos os momentos e principalmente por estarem sempre dispostas a me ajudar.

À todos os meus familiares... Que não vou escrevê-los para não cometer nenhuma injustiça, mas que sabem quem são e toda a importância que tem, por me apoiarem nos momentos difíceis e pelo carinho que sempre me dedicaram.

Aos meus futuros sogros Tereza e José, e aos meus cunhados por torcerem por mim e por terem me recebido de coração aberto nesta "nova família".

Às minha colegas de trabalho, Sandra, Marfy, Valéria e à minha coordenadora Maria Aparecida por acreditarem em mim e por terem me recebido tão bem num dos momentos mais difíceis da minha vida...

À Nide, minha segunda mãezona, por todo apoio e todo carinho dedicados neste pouco tempo que nos conhecemos...

E principalmente a Deus, pela força, pelos inúmeros momentos que segurou em minha mão, me levantou, guiou e fortaleceu, pelos momentos felizes, pelas bênçãos, pela luz em todos os momentos e por permitir que eu chegasse até aqui, finalizando mais uma etapa em meu caminho.

ÍNDICE

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	6
1.0. INTRODUÇÃO.....	10
2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Ordem Hymenoptera Aculeata, sua distribuição no Brasil e importância.....	14
2.2. Acidentes com Hymenoptera sociais: reações alérgicas e tóxicas, locais ou sistêmicas.....	15
2.3. Composição e propriedades bioquímicas do veneno de Hymenoptera	18
2.4. Importância dos estudos bioquímicos e moleculares do veneno.....	22
3.0. OBJETIVOS	30
4.0. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. MATERIAL	33
4.2. MÉTODOS	33
4.2.1. Desenho de iniciadores gene-específicos	33
4.2.2. Extração de RNA.....	34
4.2.3. Síntese da primeira e da segunda fita de cDNA.....	35
4.2.4. Amplificação de cDNA-gene específico e determinação da seqüência de cDNA do gene de hialuronidase através de reações de 3' RACE-PCR.....	35
4.2.5. Purificação dos produtos de PCR.....	37
4.2.6. Reparo com T4 DNA polimerase.....	37
4.2.7. Análise dos sítios de restrição na seqüência completa do gene a ser clonado	37
4.2.8. Clonagem	38
4.2.8.1. Reação de ligação de DNA	38
4.2.8.2. Obtenção de bactérias competentes.....	39
4.2.8.3. Transformação das bactérias	39
4.2.8.4. Análise das colônias recombinantes (brancas) por PCR.....	39
4.2.9. Extração de DNA plasmidial (“mini-preps”)	40
4.2.10. Protocolo de PCR para sequenciamento.....	41
4.2.11. Purificação com isopropanol.....	41
4.2.12. Análise das seqüências através de pesquisas no Banco de Dados.....	42
5.0. RESULTADOS	44
5.1. Extração de RNA total	44
5.2. Síntese do cDNA.....	45
5.3. Amplificação de cDNA através de reações de RACE-PCR.....	48
5.3.1. Influência da temperatura de anelamento e quantidade de iniciadores utilizados nas reações de RACE-3'	48
5.4. Purificação dos produtos da PCR.....	49
5.5. Sequenciamento Direto e Clonagem dos Produtos amplificados.....	49
5.6. Desenho de novos iniciadores para obtenção da seqüência completa do gene de hialuronidase do veneno de <i>Polybia paulista</i>	57
5.7. Amplificação de cDNA através de reações de RACE-PCR para o gene completo de hialuronidase.....	59
5.7.1. Influência da temperatura de anelamento e quantidade de iniciadores utilizados nas reações de RACE-3'	59
5.8. Purificação do produto de PCR.....	63
5.9. Clonagem do gene completo de hialuronidase.....	63
5.10. Análise da seqüência através de pesquisas no banco de dados	68
6.0. DISCUSSÃO	87
7.0. CONCLUSÕES.....	99
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

RESUMO



RESUMO

Hialuronidases pertencem a um grupo de enzimas hidrolíticas, as quais degradam o ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molecular, encontrado em todos os tecidos de mamíferos e fluídos corpóreos. O ácido hialurônico é um componente da matriz extracelular de vertebrados, que preenche os espaços entre células e fibras, e age como lubrificante, bem como uma barreira à penetração de partículas estranhas. Os níveis de ácido hialurônico são marcadamente aumentados durante a embriogênese, inflamação, transformação maligna e em qualquer lugar que seja requerido a rápida substituição de tecido e remodelamento. Os defeitos no metabolismo do ácido hialurônico parecem relacionar-se a várias doenças sugerindo que o seu nível seja altamente controlado. No entanto, surpreendentemente, o estudo de enzimas envolvidas na síntese e degradação do ácido hialurônico tem sido negligenciado.

Em venenos de insetos Hymenoptera (abelhas, formigas e vespas), a hialuronidase é uma enzima comum e um dos mais importantes alérgenos, sendo também, o único em potencial, que pode promover reatividade-cruzada entre os venenos de abelhas e vespas, como também entre os de diferentes gêneros e espécies de vespídeos, levando à produção de reações alérgicas mediadas por IgE, umas das maiores causas de anafilaxia em pacientes alérgicos ao veneno.

Neste trabalho, através da metodologia de RACE-PCR, foi determinada e caracterizada, a seqüência completa de cDNA do alérgeno - hialuronidase - do veneno da vespa urbana *Polybia paulista*, a qual, é bastante agressiva e abundante no Estado de São Paulo, sendo responsável por muitos acidentes de importância médica, devido ao

seu veneno que, assim como em outros vespídeos, apresenta três conhecidos alérgenos - hialuronidase, fosfolipase e antígeno 5.

O cDNA foi obtido a partir do mRNA extraído dos abdomens dos insetos e amplificado por iniciadores gene-específicos. Inicialmente, duas seqüências consecutivas de aproximadamente 800 e 600pb foram obtidas, purificadas, clonadas e seqüenciadas e, posteriormente, a seqüência completa de cDNA de hialuronidase de 991 pb foi obtida, purificada e diretamente seqüenciada. Os dados obtidos foram analisados e comparados com seqüências similares a partir do GenBank. A hialuronidase de *Polybia paulista* apresentou grande identidade de nucleotídeos com as espécies: *Polistes annularis* (93%), *Vespula vulgaris* (81%), *Vespula germânica* (81%) e *Dolichovespula maculata* (80%). Devido aos elevados níveis de identidade aqui observados, podem ser propostos potenciais padrões de altos níveis de reatividade cruzada entre o veneno destas espécies. A seqüência traduzida revelou que a enzima apresenta 329 aminoácidos, sendo mais rica nos aminoácidos asparagina, glutamina e lisina e apresenta massa molecular de 38532,69 Daltons. A região aberta de leitura (ORF) da hialuronidase de *Polybia paulista* se encontra na região entre a base 26 até a base 990.

A análise dos domínios conservados mostrou que a seqüência é integrante da família Glyco_hidro 56, que codifica para a enzima hialuronidase em diferentes tecidos e organismos. A proteína também apresentou domínios similares a alérgenos homólogos de outras espécies, como a hialuronidase do veneno de abelhas (*Api m 2*) e a hialuronidase do veneno de *Dolichovespula maculata*. Outras proteínas similares encontradas foram: os precursores das hialuronidases tipo 1, 2 e 3 em humanos (hialuronidase tipo 1 é a principal hialuronidase do plasma humano sendo uma forte candidata no envolvimento dos processos de supressão de tumores); o precursor da hialuronidase tipo 1 de *Mus musculus*, (também envolvida em processos de supressão de tumores), hialuronidase PH-20 de humanos, coelho, cachorro e porquinho-da-índia (uma proteína de membrana do espermatozóide, com papel essencial na adesão espermatozóide-óvulo); o precursor da hialuronidase PH-20 de rato, e uma proteína hipotética de *Caenorhabditis elegans*.

A modelagem da estrutura da hialuronidase de *Polybia paulista* foi realizada com base na estrutura de rVes v 2, hialuronidase recombinante de *Vespula vulgaris*, determinada por Skov *et al.*(2006), a qual, apresenta grande similaridade de estrutura

com o alérgeno correspondente de *Apis mellifera* (Api m 2), (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000). A estrutura da enzima de *Polybia paulista* mostrou 92% de similaridade com a estrutura de rVes v 2 e revelou-se como uma proteína dimérica. Da mesma forma que em rVes v 2, a estrutura da enzima de *Polybia paulista* se apresenta em um barril central $(\beta/\alpha)_7$ sendo estabilizada por duas pontes dissulfeto Cys 10/Cys300 e Cys 177/Cys189, e apresenta quatro potenciais sítios de glicosilação - Asn 70, Ser 90, Asn 179 e Asn 317, responsáveis por sua atividade imunogênica. A partir de um outro modelo, construído com base na estrutura da hialuronidase do veneno de abelha - Api m 2, na qual, a enzima está complexada com o tetrâmero de ácido hialurônico (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000), tanto a posição do sítio ativo da hialuronidase de *Polybia paulista*, quanto os resíduos que fazem contatos polares com as hidroxilas e os átomos de nitrogênios do ácido hialurônico puderam ser inferidos, sendo eles: Glu 100, Asp 98, Tyr 42, Tyr 171, Tyr 214, Ser 289 e Ser 290. Todos estes resíduos estão a uma distância menor do que 3,0 Å do substrato, que é uma condição necessária para haver interação entre eles e um papel importante na catálise.

Desta forma, os resultados aqui obtidos trazem importantes informações sobre a hialuronidase de *Polybia paulista*, viabilizando mais estudos sobre sua imunogenicidade e atividade imunológica cruzada com a hialuronidase de outros vespídeos, como também abrem a perspectiva de pesquisas sobre sua expressão gênica e a possibilidade de utilização da enzima recombinante como antídoto específico aos efeitos nocivos do veneno, em pacientes alérgicos, com elevados níveis de IgE específico a este alérgeno.

ABSTRACT

ABSTRACT

Hyaluronidases are a group of hydrolytic enzymes which degrade Hyaluronic acid (HA), the most abundant glycosaminoglycan of vertebrate extracellular space. HA is a high molecular weight polysaccharide found in virtually all mammalian tissues and body fluids, where it fills the space between cells and fibers and acts as a lubricant as well as a barrier to penetration by foreign particles. Hyaluronic acid levels are markedly increased during the embryogenesis, inflammation, malignant transformation and whenever fast tissue turnover and remodeling is required. Defects in HA metabolism appear to be related to various diseases suggesting that the level of HA must be tightly controlled. Surprisingly, the study of the enzymes involved in HA synthesis and degradation has been greatly neglected.

In venoms of Hymenoptera insects (bees, ants and wasps), the hyaluronidase is a common enzyme and one of the most important allergen, being potentially the unique that are able to promote immunological cross-reactivity between venoms from bees and wasps, and also among vespid venoms from different genus and species, producing allergic reactions IgE-mediated, one of the main causes of anaphylaxis in venom-allergic patients.

In this work, by the RACE-PCR methodology, the hyaluronidase cDNA complete sequence from the urban wasp *Polybia paulista* was determined and characterized. This wasp is very aggressive and abundant in the São Paulo state, being responsible for many accidents of medical importance due its venom, which contains,

like other vespids, three well known allergens- hyaluronidase, phospholipase and antigen 5.

The cDNA was obtained from mRNA extracted from insect abdomens and amplified by gene-specific primers. At first, two consecutive sequences of about 800 and 600 bp were obtained, purified, cloned and sequenced. After, the hyaluronidase cDNA complete sequence of 991pb was obtained, purified and directly sequenced. The resulting data were analyzed and compared with similar sequences from GenBank. The hyaluronidase from *Polybia paulista* displayed high identity of nucleotides with *Polistes annularis* (93%), *Vespula vulgaris* (81%), *Vespula germânica* (81%) and *Dolichovespula maculata* (80%). Due to these high identity levels, also high levels of cross-reactivity among these species could be proposed. The protein presented 329 amino acids being more rich in the amino acids asparagine, glutamine and lysine, and showed a molecular weight of 38532,69 Daltons. The open reading frame (ORF) of the hyaluronidase cDNA sequence is between the bases 26 and 990.

The conserved domains analysis revealed that the sequence is integrant of the Glyco_hydro 56 family, which codifies to the enzyme hyaluronidase in different tissues and organisms. The protein also presented similar domains to the same protein hyaluronidase in another species, such as, hyaluronidase of bee venom (Api m 2) and the hyaluronidase of *Dolichovespula maculata* venom. Other similar proteins were the hyaluronidase gene precursors from types 1, 2 and 3, in human (Hyal 1 is a major hyaluronidase of human plasm and a conserved candidate to tumor suppressor); hyaluronidase gene precursor type 1 of *Mus musculus* (also involved in the process of tumor suppression); PH-20 protein from human, rabbit, dog and guinea-pig (a sperm membrane protein, with essential role in the sperm-ovule adherence); PH 20 hyaluronidase precursor of rat and, the hypothetic protein of *Caenorhabditis elegans*.

The structure modelling of the *Polybia paulista* hyaluronidase was designed with basis on the rVes v 2 structure, the recombinant hyaluronidase from *Vespula vulgaris*, determined by Skov *et al.*(2006), what presents great similarity with the corresponding *Apis mellifera* allergen (Api m 2), (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000). The structure of *Polybia paulista* enzyme showed 92% of similarity with the structure from rVes v 2 and displayed a dimeric conformation. In the same way as occurs in rVes v 2, the structure of *Polybia paulista* enzyme exhibits a central barrel

$(\beta/\alpha)_7$ that is stabilized by two disulfide bonds Cys 10/Cys300 and Cys 177/Cys189. Four potential glycosylation sites were identified - Asn 70, Ser 90, Asn 179 and Asn 317, which should be responsible by its immunogenic activity. From another model, designed with basis on the bee hyaluronidase structure - Api m 2, in which the enzyme was co-crystalised with the substrate hialuronic acid (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000), the active site position of the *Polybia paulista* hyaluronidase as the residues that make polar contact with the hydroxyl and the nitrogen atoms from the hialuronic acid could be inferred: Glu 100, Asp 98, Tyr 42, Tyr 171, Tyr 214, Ser 289 and Ser 290. All of these residues are in a distance of less than 3,0 Å from the substrate, a necessary condition to have interaction between them and a important role in catalysis.

From this, the results obtained here may be considered as important information about the *Polybia paulista* hyaluronidase, making possible more studies about its immunogenic activity and cross-reactivity with the same enzyme from other vespids, and open the perspective to work on its gene expression to verify the possibility of using the recombinant hyaluronidase as an specific antidote to the venom harmful effects in allergic patients, with high levels of IgE specific to this allergen.

INTRODUÇÃO

1.0. INTRODUÇÃO

Os Hymenoptera Aculeata (insetos com ferrão), que normalmente interagem com o homem, pertencem às superfamílias Apoidea e Vespoidea, que incluem as famílias Apidae (abelhas), Vespidae (vespas) e Formicidae (formigas), sendo que, os acidentes com estes insetos são muito frequentes no Brasil. Existem aqui no país, cerca de 450 espécies de vespas, no entanto, a composição do veneno de poucas delas tem sido devidamente caracterizada. Todos os estudos existentes até o momento sobre a composição e mecanismo de ação das peçonhas de Hymenoptera concentram-se em abelhas, em algumas espécies de vespas sociais de clima temperado e em algumas espécies de formigas, existindo ainda pouca informação sobre outros grupos.

De toda a forma, o estudo e a caracterização das proteínas do veneno de Hymenoptera sociais (abelhas, formigas e vespas) têm despertado um crescente interesse, visto que, as ferroadas de muitos desses insetos podem causar sérias reações alérgicas ao homem, tal como, as reações sistêmicas, acompanhadas de choque anafilático. A mortalidade, causada por choque anafilático, chega a corresponder a cerca de 3% na população alérgica ao veneno de Hymenoptera, segundo análises feitas por Pastorello *et al.* (1997), e esse número ainda parece ser subestimado, pois, muitas mortes consideradas como mortes desconhecidas, após terem sido analisadas, demonstraram alto nível de IgE específico ao veneno de insetos.

As vespas sociais, de maneira geral, formam grandes colônias e muitas delas já se adaptaram à urbanização, construindo seus ninhos nas paredes de residências. Esses

insetos são bastante agressivos, e sua convivência com o homem tem causado muitos acidentes provocados por suas ferroadas.

Os venenos de todos os Hymenoptera com ferrão contêm elementos protéicos ou peptídicos, sintetizados como moléculas precursoras (GMACHL; KREIL, 1995), as quais permanecem armazenadas no reservatório ou saco de veneno até o momento da ferroadada, quando por mecanismos ainda desconhecidos se tornam ativas ou maduras. Muitos destes elementos apresentam propriedades farmacológicas (BLUM, 1985). Devido ao fato de que a maior parte das proteínas de veneno é composta de enzimas, toxinas específicas ou outras moléculas bioativas, em geral, as pesquisas sobre os venenos têm levado a um número significativo de descobertas em diferentes áreas da biologia e medicina, além das áreas de estudo das alergias e da imunologia.

Estudos envolvendo a tecnologia do DNA recombinante, como a construção de bibliotecas de cDNA para a determinação da seqüência de genes dos principais constituintes do veneno de cobras, abelhas e vespas, têm demonstrado, nestes organismos, aspectos bastante interessantes sobre a origem e a organização dos genes, a possível estrutura tridimensional dos alérgenos recombinantes de veneno, bem como, a função comparativa destes alérgenos obtidos, com os naturais. Em estudos feitos por Fang *et al.* (1988) foi possível determinar as estruturas primárias das formas 2 e 3 do antígeno 5 de *Dolichovespula maculata*, através da construção de uma biblioteca de cDNA do veneno.

Os precursores de constituintes do veneno de abelhas, como a apamina e o peptídeo MCD também foram estudados (GMACHL; KREIL, 1995), demonstrando-se que ambos são codificados por dois genes “in tandem”, os quais compartilham o mesmo exon 3’. Além disto, os autores também determinaram as seqüências de cDNA dos genes que codificam os precursores do peptídeo MCD e apamina. Siigur *et al.* (2001) estudando proteases em venenos de cobras da espécie *Vípera lebetina*, demonstraram através do sequenciamento do cDNA e de aminoácidos que, devido a mutações, as serino-proteínases presentes se apresentavam em quatro formas homólogas, mas com diferentes atividades biológicas. Através destes exemplos, verifica-se então, que, através de técnicas de clonagem de cDNA, a estrutura e as moléculas precursoras dos principais alérgenos de veneno podem ser também elucidadas, vindo a auxiliar no entendimento

dos mecanismos de ação dos venenos e mesmo, nos mecanismos de maturação de seus constituintes.

Polybia paulista, conhecida popularmente como “paulistinha”, é uma vespa muito comum no Sudeste do Brasil, especialmente no estado de São Paulo. Esta vespa constrói seus ninhos nas paredes das residências ou em suas proximidades. Durante o ato de ferrear, cada operária sofre autotomia do ferrão na pele da vítima, podendo injetar até 20 µg de peçonha. Oliveira (1994) detectou, no veneno de *Polybia paulista*, atividade fosfolipásica, hialuronidásica, proteolítica e hemolítica dentre outras, e determinou que o veneno desta vespa possui atividade miotóxica superior a de alguns venenos botrópicos (OLIVEIRA, 2000).

A ocorrência de atividade hialuronidásica já foi encontrada no extrato bruto das glândulas de veneno da vespa social *Polybia paulista* e a análise por eletroforese em gel de poli(acrilamida), na presença de SDS, evidenciou que a hialuronidase dessa espécie de vespa é dimérica apresentando subunidades de 64.000 e 55.000 Daltons. Verificou-se ainda que o pH ótimo da enzima é igual a 5,0 e sua atividade é fortemente inibida na presença de metais pesados como o cobre, o ferro e o zinco (OLIVEIRA, 1994).

Assim, tendo-se em conta que a vespa *Polybia paulista* é um dos insetos responsáveis pela grande incidência de acidentes importantes sob o ponto de vista médico, e considerando que o conhecimento de detalhes a respeito dos alérgenos de veneno são pré-requisitos para novos modos de prevenção, diagnósticos e terapias, e ainda, frente à necessidade de se desvendar o mecanismo de ação, estrutura e organização gênica dos alérgenos do veneno de insetos, este trabalho teve por objetivo, a busca da seqüência de cDNA da enzima hialuronidase do veneno de *Polybia paulista*, a partir de reações de RACE-PCR (*Rapid Amplification of the cDNA Ends using the Polymerase Chain Reaction*). A determinação da seqüência gênica, deste alérgeno neste trabalho, tem uma elevada importância no contexto da linha de pesquisa sobre venenos de Hymenoptera, pois viabiliza um grande número de estudos posteriores, tais como: determinação da organização do gene; determinação da seqüência da molécula precursora e busca de sítios de clivagem que possam levar ao esclarecimento dos mecanismos de maturação e regulação da atividade, expressão e caracterização do alérgeno recombinante em relação ao alérgeno natural, incluindo a identificação real de seus epítomos imunogênicos e mecanismo de ação frente ao substrato.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ordem Hymenoptera Aculeata, sua distribuição no Brasil e importância.

A ordem Hymenoptera Aculeata, abrange aproximadamente 50 mil espécies, das quais 10 a 15 mil são formigas, 10 mil são abelhas, e as restantes vespas (CHAUDNETTO *et al.*, 1994). Somente nesta ordem podem ser encontrados insetos com ferrão, aparato utilizado como uma eficiente arma para ataque e defesa. (RICHARDS; DAVIES, 1984). Este aparato, na ordem Hymenoptera Aculeata, é derivado do ovipositor, o que explica por que apenas as fêmeas são capazes de ferroar (MANZOLI-PALMA; PALMA, 1992). Entretanto existem controvérsias sobre este assunto (HOFFMAN; JACOBSON, 1996).

No Brasil, entre as espécies de Hymenoptera mais abundantes e de maior importância estão as abelhas do gênero *Apis* (*Apis mellifera mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica*, *A. m. scutellata*, *A. m. carnica* e os híbridos africanizados) e do gênero *Bombus* (*B. atratus* e *B. morio*). Quanto às espécies de vespas mais frequentes, têm-se as do gênero *Polistes* (*P. simillimus*, *P. versicolor*, *P. lanio lanio*), do gênero *Polybia* (*P. paulista*, *P. ignobilis*) e do gênero *Agelaia* (*Agelaia pallipes pallipes*). Em relação às formigas têm-se as do gênero *Solenopsis*, representada principalmente pela espécie *S. saevissima* (MANZOLI-PALMA; PALMA, 1992).

A família Vespidae é constituída por três subfamílias: Stenogastrinae, Vespinae e Polistinae. No Brasil, apenas a subfamília Polistinae é encontrada, sendo esta

constituída por três tribos: Ropalidiini, Polybiini e Polistini. Dentro da tribo Polybiini encontram-se as vespas do gênero *Polybia*.

Pesquisas relacionadas com a biologia das vespas nas Guianas (RICHARDS; RICHARD, 1951) e no Mato Grosso do Sul (RICHARDS, 1978) demonstraram que o gênero *Polybia* é o mais abundante da família Polistinae.

Os representantes de Polistinae são também encontrados em todo o mundo, mas a maior diversidade é encontrada em regiões tropicais, especialmente na Região Neotropical. A fauna mundial é constituída por 26 gêneros e mais de 900 espécies, sendo que, no Brasil ocorrem 22 gêneros e 304 espécies.

Embora todo o conhecimento popular sobre as vespas gire em torno de suas dolorosas ferroadas e do grande número de indivíduos que saem do ninho para atacar, cabe dizer que não podemos deixar de levar em conta a contribuição destes insetos tanto no aspecto ecológico quanto no econômico. A grande maioria das vespas, inclusive as do gênero *Polistes* é predadora de inúmeras pragas agrícolas e, conseqüentemente, agentes valiosos para o controle biológico destas (DE BACH, 1951).

Além da importância destas vespas no controle biológico, é importante também pesquisar seus venenos sob vários aspectos que vão desde o estudo e caracterização, para melhor utilização dos mesmos em tratamentos, como as imunoterapias para pacientes sensíveis a ferroadas de Hymenoptera até a produção de inseticidas naturais a partir dos venenos e/ou seus componentes, podendo-se assim, eliminar vários problemas acarretados pelo uso de inseticidas tradicionais (BONFANTI-ALMEIDA, 1994).

2.2. Acidentes com Hymenoptera sociais: reações alérgicas e tóxicas, locais ou sistêmicas.

Os acidentes envolvendo os Hymenoptera sociais ocorrem com grande frequência, pois estes insetos costumam construir seus ninhos próximos a áreas urbanas (embora também construam seus ninhos em áreas rurais). Assim, pelo seu grande contato com o homem, podem atacá-lo quando este representar voluntária ou involuntariamente uma ameaça.

Esses insetos produzem venenos que podem causar sérios danos a um possível agressor. O veneno constitui um mecanismo de defesa da colônia (PIEK, 1985), a qual

representa fonte de alimento dos insetos e o local de armazenamento de mel. Para os Hymenoptera sociais, este mecanismo de defesa é muito importante, pois a colônia vive por muito tempo e não pode mudar-se rapidamente quando ameaçada (SCHMIDT, 1982), uma vez que, toda a progênie, em estágio imaturo, seria deixada para trás, e haveria mais gastos de energia na construção de uma nova colônia. Por outro lado, as vespas solitárias injetam o veneno, com o intuito de paralisar a presa, a qual servirá como alimento ou hospedeiro para a larva parasitária da vespa (PIEK, 1985). A maioria das espécies de Hymenoptera é constituída por vespas parasitas e predadoras (SCHMIDT, 1982).

Nas últimas décadas, devido à grande importância médica dos venenos de himenópteros, a existência de muitas pessoas sensíveis aos mesmos e ainda, ao fato de que, os venenos de vespas têm demonstrado extensa ação nos tecidos nervosos centrais de muitas espécies de mamíferos, tem-se observado um interesse crescente dos pesquisadores pelo estudo dos venenos de Hymenoptera sociais, através do esclarecimento cada vez mais aprofundado de sua composição bioquímica, estrutura e propriedades de seus componentes, e de seus mecanismos de ação. Na população, a sensibilidade aos venenos de Hymenoptera foi estimada entre 9,3 e 28,5% (GOLDEN *et al.*, 1997). Nos EUA, 1% das crianças e 4% dos adultos já experimentaram reações sistêmicas depois de serem ferroados por abelhas e vespas (VALENTINE, 1984).

A prevalência de alergia a venenos de insetos é freqüentemente avaliada devido aos altos índices de acidentes por ferroadas de Hymenoptera. Estudos epidemiológicos realizados em países europeus demonstraram que 20% das vítimas de acidentes por ferroadas de insetos apresentaram sintomas alérgicos locais, 15% apresentaram reações sistêmicas e 17% dos casos eram pacientes assintomáticos. Entretanto, estes pacientes apresentaram testes positivos de IgE específica, pressupondo que os mesmos estão predispostos a desenvolver reações alérgicas numa próxima ocorrência (NITTER-MARSZALSKA *et al.*, 2004).

Segundo Hoffman (1996), as reações alérgicas ao veneno de Hymenoptera são o resultado da combinação dos alérgenos com mastócitos e anticorpos IgE, que causam uma cascata de liberação de mediadores. Estes mediadores incluem a histamina, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, enzimas, peptídeos e outras substâncias que produzem efeitos diversos. Como as proteínas são os principais alérgenos ativos do

veneno, King (1996) sugeriu que poderia haver uma similaridade entre as seqüências de aminoácidos dos alérgenos do veneno e das proteínas presentes nos tecidos das vítimas das ferroadas. Assim, o sistema imune da pessoa alérgica passaria a reconhecer suas próprias proteínas quando esse sistema fosse ativado para responder aos alérgenos do veneno, o qual, contém seqüências similares.

Estudos revelaram que grandes reações locais ocorrem em 2,3 a 18,9% da população e reações sistêmicas em 0,4 a 7,5% (HERBERT; SALKIE, 1982; GOLDEN *et al.*, 1997; GRIGOREAS *et al.*, 1997; KALYONCU *et al.*, 1997; NITTNER-MARSZALSKA *et al.*, 1998; NOVEMBRE *et al.*, 1998).

King *et al.* (2003), ao estudar um grupo de sete pacientes sensibilizados pelo veneno da formiga *Pachycondyla chinensis*, relatou manifestações clínicas de processos anafiláticos característicos como: urticária, rinites alérgicas, hipersensibilidade brônquica, paradas cardíacas e perda de consciência. Por outro lado, Lichtenstein *et al.* (1974) e Bernstein *et al.* (1989), observaram anteriormente que, a administração de injeções subcutâneas de doses cada vez maiores de veneno de Hymenopteras, durante 6 a 14 semanas em pacientes sensíveis, levou a uma redução de riscos de reações anafiláticas sistêmicas após ferroadas subseqüentes.

Devido aos componentes vasoativos do veneno de Hymenoptera, muitas pessoas apresentam reações locais quando ferroadas por vespas, ocasionando rubores, edemas e dores prolongadas. Essas reações são limitadas, pois desaparecem em poucas horas, contudo, se a ferroada ocorrer perto ou na cavidade oral pode comprometer a respiração da vítima. Ocasionalmente, os edemas podem permanecer por várias semanas, podendo agravar com a presença de infecções secundárias, o que, ocorre normalmente em acidentes com formigas. Outros eventos decorrentes de ferroadas de vespas também ocorrem, como pruridos locais, urticária, angioedema, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, perda de memória e tontura. As reações sistêmicas são os quadros mais agravantes, os quais envolvem hipotensão, arritmia, bronco espasmos, paradas cardíacas e respiratórias e morte do paciente sensível. (REISMAN *et al.*, 1989). Os acidentes também podem causar falência renal aguda, seguida de uma necrose tubular também aguda (REIS *et al.*, 1998).

Após múltiplas ferroadas, pode ocorrer uma reação tóxica ocasionando náuseas, vômitos, falta de ar e perda de consciência (HEINING *et al.*, 1988). Em alguns

casos foi relatada a ocorrência de hemólise intravascular, trombocitopenia, inflamação hepática aguda e infarto do miocárdio após múltiplas ferroadas (SHILKIN *et al.*, 1972; BOUSQUET *et al.*, 1984).

Embora os venenos de Hymenoptera apresentem vários tipos de peptídeos e proteínas, alguns dos quais, podem induzir toxicidade e respostas vasoativas, estima-se que cerca de 1500 ferroadas seriam necessárias para injetar uma dose letal de veneno num adulto de 70 Kg (GODDARD, 2003). Contudo, 40 mortes por ano são atribuídas a ferroadas de Hymenoptera nos EUA (BARNARD, 1973).

A quantidade de veneno injetado por um vespídeo é aparentemente pequena, cerca de 10µg (KING, 1996), mas apesar disso, uma única ferroada é capaz de causar sérias reações alérgicas em indivíduos hiperalérgicos. A resposta alérgica individual varia com os tipos de componentes presentes no veneno e, somente uma minoria de pessoas desenvolve hipersensibilidade.

Os alérgenos encontrados em venenos de vespas apresentam a propriedade de sensibilizar, ou seja, induzir o sistema imune a produzir anticorpos com elevada especificidade, e desencadear sintomas alérgicos em pacientes sensibilizados. Um dos maiores desafios da alergia molecular é prever o potencial alergênico das proteínas, tem-se atribuído às atividades hialuronidásica e fosfolipásica, o início da reação alérgica (SHEKENDEROV, 1974). Estudos moleculares que levam à identificação dos epítomos imunogênicos dos alérgenos são muito relevantes porque permitem identificar as regiões da molécula do alérgeno que interagem com os anticorpos do paciente sensibilizado, os alérgenos mais importantes são geralmente caracterizados por serem solúveis, estáveis, apresentarem compactação na sua estrutura tridimensional e pela prevalência de IgE nos pacientes sensibilizados (BREITENEDER *et al.*, 1999).

2.3. Composição e propriedades bioquímicas do veneno de Hymenoptera.

Os venenos de Hymenoptera sociais são misturas complexas de aminas biogênicas, peptídeos e proteínas (enzimas). Apresentam atividades farmacológicas, causadas pelos peptídeos e alergênicas, causadas pelas proteínas e enzimas (EINARSSON; MOBERG, 1981), sendo as reações alérgicas as mais abundantes (HOFFMAN *et al.*, 1983). Dentre as proteínas e enzimas alergênicas, que são

geralmente os componentes de elevada massa molecular dos venenos de Hymenoptera, encontram-se fosfolipases (mais abundantemente: A₂ em abelhas e A₁ em vespas e formigas), hialuronidases, esterases, fosfatases ácidas, proteases, proteína antígeno 5 (em vespas) e o peptídeo melitina, na forma tetramérica em abelhas.

Estes componentes do veneno são sintetizados na forma de moléculas precursoras (GMACH; KREIL, 1995) de alta massa molecular, as quais permanecem armazenadas nos reservatórios ou sacos de veneno até o momento da ferroadada, quando por mecanismos ainda não esclarecidos se tornam maduros.

Estudos demonstraram que a toxicidade do veneno de vespas requer a ação sinérgica dos componentes inflamatórios do veneno. Segundo King *et al.* (2003), um mastoparano com ação degranuladora de mastócitos potencializa a ação da fosfolipase A₁ nas respostas associadas a processos inflamatórios.

A hialuronidase (EC 3.2.1.35) hidrolisa o ácido hialurônico, um grande glicosaminoglicano, que se localiza na matriz extracelular de quase todos os tecidos como um componente que conecta filamentos de proteína, fibras de colágeno e células. Assim, a união das células nos tecidos, é promovida pelas propriedades adesivas do ácido hialurônico, o qual, preenche os interstícios celulares. Quando o ácido hialurônico é hidrolisado pela ação da enzima, o polímero é transformado em fragmentos menores, tornando-se menos viscoso e permitindo assim, a difusão dos demais componentes do veneno para o interior das células. Por isso a hialuronidase é conhecida como “fator de difusão” (DOTIMAS; HIDER, 1987). O processo metabólico ainda não é completamente entendido, mas sabe-se que determinadas hialuronidases (tipo 2) degradam polímeros de aproximadamente 107 KDa em fragmentos de 20 KDa, sendo que outras (tipo 1) degradam ainda mais, promovendo a obtenção de tetrassacarídeos. (SKOV *et al.*, 2006).

A hialuronidase tem sido, em geral, descrita como uma enzima estável em um largo espectro de temperatura, pH e agentes denaturantes. No entanto, observou-se para hialuronidases do veneno de escorpiões (KEMENY *et al.*, 1984; RAMANAIAH *et al.*, 1990; MOREY *et al.*, 2006) que seu pH ótimo está entre 3,6 e 4,5 e sua atividade ótima em 37°C, ocorrendo perda de atividade acima de 40 ou 50°C.

A hialuronidase é uma glicoproteína com peso molecular variando entre 35 e 41 KDa em abelhas; aproximadamente 45 KDa em vespas; 52 a 82 KDa em escorpiões

e 52 a 70,4 KDa em espécies de cobras, apresentando, em determinados casos, duas isoformas para a mesma espécie, com valores similares de pI (ponto isoelétrico) (KEMENY *et al.*, 1984; RAMANAIAH *et al.*, 1990; KING; SPANGFORT, 2000; KUDO; TU, 2001; GIRISH *et al.*, 2004; GIRISH; KEMPARAJU, 2005; KOLARICH *et al.*, 2005; MOREY *et al.*, 2006; SKOV *et al.*, 2006). Essa enzima tem sido também encontrada no veneno de aranhas (GIRISH; KEMPARAJU, 2005).

Determinadas hialuronidases são específicas para o ácido hialurônico (como certas hialuronidases do veneno de cobras) ou podem também degradar sulfatos de condroitina (tais como as hialuronidases presentes em venenos de escorpiões) e podem ainda serem inibidas por substâncias como heparina, curcumina, endometacina e ácido tânico (KUDO; TU, 2001; GIRISH *et al.*, 2004; GIRISH; KEMPARAJU, 2005; MOREY *et al.*, 2006).

Markovic-Housley *et al.* (2000) determinaram a estrutura cristalográfica da hialuronidase de abelhas. Esta enzima mostra 30% de identidade de sequência com hialuronidases humanas envolvidas em processos de fertilização e é uma 1,4 beta-glicosidase, pertencente à família 56 das glicosidases. Os autores demonstraram que a topologia da molécula se parece com um barril (β/α) e, apresenta uma longa fenda de ligação ao substrato, que se estende através da extremidade C-terminal. Esta estrutura sugere um mecanismo catalítico ácido-básico, no qual o aminoácido Glu 113 age como doador de prótons e o grupo N-acetil do substrato como nucleófilo.

A hialuronidase é amplamente responsável pela reatividade cruzada do veneno de vespas e abelhas em pessoas alérgicas (KOLARICH *et al.*, 2005) e funciona sinergisticamente com outros componentes do veneno para aumentar a atividade geral do mesmo. Esse sinergismo pode resultar na manifestação dos efeitos de ruptura que essas enzimas têm sobre as células e tecidos na região vizinha ao local da ferroadada .

A hialuronidase, tanto quanto o componente enzimático dos venenos - a fosfolipase - induzem IgE específica. Esta última hidrolisa os fosfolípidos das membranas biológicas, conduzindo à formação de poros e ocasionando a lise celular (DOTIMAS; HIDER, 1987). Além disso, também age sinergisticamente com outras toxinas, causando lise de eritrócitos e mastócitos; hipotensão, podendo ainda inibir a coagulação sanguínea (NAKAJIMA, 1986; HO *et al.*, 1994).

A proteína não enzimática antígeno 5 foi relatada como o componente mais alergênico do veneno de vespas, superando enzimas como as hialuronidasas, fosfolipases e fosfatases ácidas (NAKAJIMA, 1986). Sua função bioquímica continua desconhecida até os dias de hoje, desde os relatos de King (1996).

Além destas macromoléculas já citadas, também encontramos diversas micromoléculas no veneno de Hymenoptera e, segundo Schmidt (1982), as principais são: histamina (provoca coceira, vasodilatação, permeabilidade vascular e dor similar a uma leve queimadura); serotonina (sensação de dor e vasodilatação); acetilcolina (dor, permeabilidade vascular e vaso dilatação); dopamina e epinefrina (vasoconstrição).

A ação hidrolítica das enzimas citadas é completada pela ação de outras enzimas que auxiliam a lise celular e destroem grande parte dos substratos das células lisadas.

Em contraste com sua especificidade de ação, as proteases vêm atraindo a atenção de pesquisadores para explorar suas aplicações fisiológicas e até biotecnológicas (POLDERMANS, 1990). As proteases de veneno de serpentes geralmente estão associadas aos processos hemorrágico, coagulante e anticoagulante, atividades fibrinolítica, fibrinogenolítica, (MACKESSY, 1996), necrótica (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1983), amidolítica e estereolítica (TANIZAKI *et al.*, 1991; MACKESSY, 1996; MARRAKCHI *et al.*, 1997), embora, pouco ainda, seja conhecido sobre sua função em veneno de insetos.

As proteases, as quais catalisam a clivagem de proteínas e peptídeos, geralmente não são encontradas em quantidades muito significativas em venenos de vespídeos e de abelhas, porém, Hoffman e Jacobson (1996) encontraram em veneno de *Bombus pensilvanicus* uma grande quantidade de protease com atividade alergênica e atividade de amidase trípica. A atividade proteolítica foi também encontrada no veneno da espécie de vespa social *Polistes infuscatus*, na espécie de formiga *Eciton burchelli* (SCHMIDT *et al.*, 1986) e nas espécies de vespa *Polybia paulista*, *Polybia ignobilis*, *Agelaia pallipes pallipes* e *Apoica pallens* (RUBERTI *et al.*, 2000), embora, sua função não tenha sido determinada.

A presença de proteases nos venenos de *Polistes dominulus* e *Polistes exclamans* foi demonstrado por Mc Nairy *et al.* (2000), enquanto que uma serino protease Bom p 4 foi identificada no veneno da abelha *Bombus pennsylvanicus* por

Hoffman *et al.* (1996). Posteriormente, três serino proteases foram isoladas do veneno de *Bombus pennsylvanicus* e das vespas européias *Polistes dominulus* e *Polistes exclamans*, as quais demonstraram um elevado grau de resíduos de aminoácidos conservados em suas seqüências primárias (PANTERA *et al.*, 2003; WINNINGHAM *et al.*, 2004).

As fosfatases ácidas são importantes alérgenos do veneno, mas sua função também não está totalmente esclarecida (SCHMIDT *et al.*, 1986).

As esterases são importantes no processo de lise celular, mas, segundo Schmidt *et al.* (1986) sua função específica ainda não está definida.

A peçonha de vespas também é muito rica em peptídeos, tais como: agentes neurotóxicos, agentes hemolíticos e cininas. Estes peptídeos também têm sido encontrados em venenos de formigas.

As cininas são caracterizadas como peptídeos hipotensivos e causadores de dor que induzem permeabilidade e contração reversível em músculo liso de camundongos (SCHMIDT, 1982). Além das cininas encontramos os mastoparanos, os quais são peptídeos que induzem a degranulação de mastócitos.

Enfim, todos os componentes do veneno de Hymenoptera, em geral, agem sinergisticamente, de forma a produzir um efeito final de punição ao agressor da colônia causando-lhe um desconforto físico. Além disso, dependendo do grau de sensibilidade imunológica da vítima e do número de ferroadas (ou da quantidade de veneno injetado) podem ocorrer reações fatais.

2.4. Importância dos estudos bioquímicos e moleculares do veneno.

O conhecimento que se tem sobre a organização, estrutura dos genes e a regulação da síntese dos alérgenos de veneno ainda é muito escasso e dos poucos trabalhos já realizados, resultados muito interessantes foram obtidos. Um estudo realizado por Pantera *et al.* (2003) mostrou, através do alinhamento de seqüências de aminoácidos do alérgeno antígeno 5, a existência de uma similaridade de 85% entre os subgêneros de *Polistes* européias e norte-americanas, sendo esta, de 98% dentro do mesmo subgênero, em seu estudo realizado com os venenos de *Polistes gallicus*

(espécie européia) e de *Polistes annularis* (espécie norte-americana). A existência de epítomos específicos nas moléculas de antígeno-5 de ambas as espécies pode explicar a reatividade cruzada parcial encontrada entre os venenos de *Polistes* européias e norte-americanas e sugere que, o uso de venenos de *Polistes* européias pode melhorar o diagnóstico específico e a terapia em pacientes europeus e norte-americanos que sejam sensíveis às *Polistes* européias.

Segundo Fitch *et al.* (2006), os venenos de *Polistes* norte-americana e européia apresentam reatividade cruzada incompleta, pois, eles também apresentaram 86% de identidade de seqüência de cDNA correspondente às proteínas do antígeno 5 de *Polistes dominulus* e de *Polistes exclamans*. Com base nestes dados e nos estudos já realizados sobre o antígeno 5 eram esperados resultados de um maior grau de reatividade cruzada entre elas. As proteases destes venenos também apresentaram um baixo grau de identidade de seqüências. A protease de *P. exclamans* provocou uma produção significativamente mais baixa de IgE do que a protease de *P. dominulus*, enquanto que, o antígeno 5 do veneno de *P. exclamans* se mostrou mais potente do que o mesmo alérgeno de *P. dominulus*. Modelos tridimensionais foram gerados e comparados e os resultados levaram à conclusão de que a reatividade cruzada incompleta entre os venenos destas espécies resulta de diferenças na superfície da estrutura das moléculas dos alérgenos, que levam a variações quanto ao grau de imunogenicidade das proteases e dos antígenos 5 dos venenos.

Outro estudo realizado por Pirpignani *et al.* (2002) determinou aspectos estruturais e imunológicos do antígeno 5 de *Polybia scutellaris*, uma espécie encontrada na América do Sul. Até então, a maior parte desses estudos tinha sido feito com espécies da América do Norte e Europa. Foram realizados ensaios da degranulação de mastócitos e da mensuração da resposta IgE em ratos, utilizando tanto o veneno quanto a proteína purificada. Através destes ensaios foi possível concluir que o antígeno 5 de *P. scutellaris* é uma variante que promove uma resposta IgE reduzida bem como baixa atividade anafilática. Os dados obtidos a partir da seqüência dessa proteína em *P. Scutellaris*, mostram uma similaridade de 72,5 a 90,3 % dessa seqüência com as estruturas primárias, já determinadas, dos membros da família de antígenos 5 de vespídeos.

King *et al.* (1996) clonaram e expressaram os outros dois importantes alérgenos do veneno de *Vespula vulgaris*, a hialuronidase e a fosfolipase, que contêm 300 e 331 resíduos de aminoácidos respectivamente, e mostram 67 e 92% de identidade de seqüências com seus homólogos em *Dolichovespula maculata*. Testes com alérgenos de vespídeos indicam reatividade cruzada parcial entre suas formas homólogas, em diferentes espécies, verificando-se uma maior reatividade cruzada entre os alérgenos do veneno de vespões com os de *V. vulgaris* do que entre os de vespões e de *V. vulgaris* quando testados individualmente com os de outras espécies. A ordem de reatividade cruzada dos três alérgenos de vespídeos pode ser assim estabelecida: - hialuronidase > Ag 5 > fosfolipase - sendo que, epítomos contínuos (lineares) mostram maior índice de reatividade cruzada do que epítomos descontínuos (não-lineares e dominantes na maioria dos alérgenos de vespídeos), ressaltando-se assim, a grande importância do conhecimento da conformação tridimensional da molécula alergênica, na seleção de venenos para a realização do processo de imunoterapia em pacientes com sensibilidade a múltiplos vespídeos.

King *et al.* (2000), ainda estudando alérgenos comuns aos venenos de abelhas, formigas e vespas determinaram que os alérgenos que apresentam identidade de seqüências abaixo de 70%, raramente têm níveis detectáveis de reatividade cruzada.

Um enfoque bastante utilizado para se obter e melhor caracterizar as seqüências de nucleotídeos dos genes de veneno é através da construção de bibliotecas de cDNA. Em estudos como os realizados por Becerril *et al.* (1993) a biblioteca de cDNA se mostrou muito eficiente, possibilitando determinar e caracterizar a organização dos genes que codificam as toxinas do veneno de escorpiões mexicanos (*Centruroides noxius*), através de ampliações feitas por PCR com iniciadores específicos e de hibridizações tanto do genoma, quanto dos cDNAs da biblioteca. Naquele estudo foi possível observar que as regiões dos genes que codificam as toxinas do veneno dos escorpiões analisados, não contêm íntrons ou, quando existentes, são pequenos.

Em outro estudo realizado por Valles *et al.* (2003), uma biblioteca de expressão de DNA foi construída com formigas operárias *Solenopsis invicta* sendo que a enzima glutathiona S-transferase (GST) dessa espécie foi purificada, caracterizada, clonada e

seqüenciada. A partir da seqüência de nucleotídeos, deduziu-se a seqüência de aminoácidos do primeiro GST de formigas lava-pés.

Ng *et al.* (2005), descreveram pela primeira vez a caracterização de uma hialuronidase aquática do peixe pedra (*Synanceja horrida*) através de clones isolados de uma biblioteca de cDNA, preparada com glândulas de veneno. Esta hialuronidase foi expressa como uma molécula precursora contendo um peptídeo sinal de 28 resíduos. A proteína madura é um polipeptídeo com 449 resíduos contendo três potenciais sítios de N-glicosilação, quatro possíveis motivos de ligação ao substrato ácido hialurônico e vários resíduos implicados na ligação e catálise deste substrato.

Gmachl e Kreil (1993), utilizando uma seqüência amino-terminal previamente conhecida da hialuronidase de *Apis mellifera*, isolaram de uma biblioteca de cDNA, clones contendo o precursor desta enzima. A seqüência obtida apresentou 349 resíduos de aminoácidos, contendo quatro cisteínas e três potenciais sítios de N-glicosilação. A seqüência do precursor também indicou que a conversão da pró-enzima para o produto final deve envolver a clivagem de uma ligação Thr-Pro, uma ligação não muito usual. Esta hialuronidase exhibe significativa homologia com PH 20, uma hialuronidase de membrana do espermatozóide de mamíferos.

Posteriormente, Gmachl e Kreil (1995) também através de uma biblioteca de cDNA, determinaram a seqüência dos peptídeos apamina e MCD de veneno de abelhas. Os pesquisadores observaram que estes peptídeos, embora apresentem diferentes atividades biológicas, possuem alguma similaridade de seqüência, e esta homologia é muito mais pronunciada, quando se compara suas seqüências de cDNA e suas moléculas precursoras. Os dados destas seqüências sugerem que os genes se desenvolveram de um ancestral comum formado através de uma duplicação parcial rara. Os precursores destes peptídeos são não-usuais por duas razões. Primeiro, eles são extremamente pequenos contendo apenas 40 e 50 aminoácidos respectivamente; o segundo aspecto pelo qual estes precursores diferem dos outros numerosos peptídeos e precursores de proteínas, que têm sido analisados nos últimos anos, é o processamento de reações, pois, a conversão dos precursores da apamina e do peptídeo MCD para o produto final requer a hidrólise de Ser/Cys e Pro/Ile respectivamente, mostrando que a liberação dos produtos finais a partir dos precursores provém da clivagem de peptídeos. A organização genômica mostra três exons para o precursor do peptídeo MCD e dois

exons para o precursor da apamina e finalmente o exon 3' que está presente em ambos os RNAs. Os íntrons ocorrem em posições homólogas nos dois genes, sendo que o primeiro está localizado entre o penúltimo e o último aminoácido, enquanto o segundo está inserido antes do sexto resíduo da extremidade carboxila, constituído de 81 pb. Portanto, os resultados mostram que a região 5' do gene precursor da apamina forma parte do terceiro íntron do gene do peptídeo MCD.

Por outro lado, no trabalho realizado por Lu *et al.* (1993) foram determinadas as seqüências completas de aminoácidos de antígeno 5 de *Dolichovespula arenaria* e *maculata*, de *Vespula vulgaris* e *maculifrons* e de *Polistes annularis* e *exclamans*, através do sequenciamento de aminoácidos ou/e da clonagem de cDNA. A seqüência de aminoácidos deste alérgeno em *D. arenaria* foi deduzida a partir de amostras de cDNA amplificadas por PCR, as de *P. annularis* e *V. vulgaris* foram obtidas a partir do cDNA gene-específico do veneno, utilizando PCR e iniciadores específicos ou pela técnica de RACE, também utilizada neste nosso trabalho; e as de *Polistes exclamans* e *V. maculata* foram obtidas por degradação de proteínas intactas e digestão por endoproteínases e posterior análises de sequenciamento dos peptídeos gerados. Os dados obtidos mostraram várias regiões conservadas e variáveis nas seqüências de antígeno 5 desses vespídeos.

De acordo com o trabalho realizado por Schmidt *et al.* (2003), o veneno da formiga *Solenopsis invicta*, popularmente conhecida como “formiga lava-pés” contém quatro importantes e potentes alérgenos, os quais causam sérias reações anafiláticas em indivíduos sensíveis. A seqüência de aminoácidos de três destas proteínas de veneno - Sol i 2, 3 e 4 já foram determinadas demonstrando-se que Sol i 2 é a mais abundante das proteínas de veneno, a qual foi clonada e expressa em sua forma nativa. A seqüência completa de Sol i 3 foi obtida através de RT-PCR (técnica de transcrição reversa acoplada à reações de PCR) e de reações de PCR +1, sendo que em ambas foram utilizados oligonucleotídeos gene-específicos e oligonucleotídeos degenerados, desenhados a partir da seqüência de aminoácidos desta proteína. A seqüência determinada apresentou 705 pb correspondentes a 235 aminoácidos. Esta proteína foi então acrescida de seis resíduos de histidina na região C-terminal e expressa em células de insetos através do sistema de baculovírus. Sol i 3 representa 15-25% da sua massa total de proteínas de veneno e 44-50% de identidade com o antígeno 5 de vespídeos.

Entretanto, apesar da similaridade, nenhuma reação imunológica cruzada tem, até agora, sido observada entre Sol i 3 e os antígenos 5 de vespídeos com os anticorpos IgE humanos.

A expressão de alérgenos, na forma de proteínas recombinantes resolve o principal problema de obtenção de grandes quantidades da proteína a partir do material natural, e o uso de “etiquetas” de histidina simplifica a purificação. Todavia, é necessário comparar as proteínas recombinantes com proteínas nativas para assegurar a similaridade das propriedades. No trabalho de Schmidt *et al.* (2003), foi relatada a seqüência completa de cDNA do alérgeno Sol i 3 e a produção e caracterização da proteína recombinante em sua forma imunoreativa. Sol i 2, 3 e 4 foram anteriormente clonados e expressos e se mostraram específicos de “formigas lava-pés”, sendo que Sol i 1, a fosfolipase do veneno, ainda não foi completamente clonada e é o alérgeno do veneno destas formigas que apresenta maior reatividade cruzada com proteínas do veneno de vespas.

Soldatova *et al.* (1998), expressaram a hialuronidase recombinante do veneno de abelhas em sistemas procarióticos e eucarióticos e compararam suas atividades com a atividade da enzima natural. A atividade da enzima expressa em células de insetos infectadas por baculovírus mostrou atividade igual a da enzima natural, indicando uma conformação estrutural semelhante entre a proteína nativa e a recombinante, enquanto a expressa em *E.coli* apresentou apenas 20-30% da atividade da enzima natural. No entanto, Skov *et al.* (2006) expressaram a hialuronidase de *Vespula vulgaris* (Ves v 2) em *E. coli* e após re-enovelamento e purificação, a enzima ativa mostrou atividade comparável à da enzima natural; eles também fizeram a caracterização bioquímica e determinaram a estrutura cristalográfica da enzima. Três sítios de N-glicosilação foram identificados - Asn 79, Asn 99 e Asn 127, por um mecanismo de digestão enzimática combinada com espectrometria de massas, revelando na estrutura um barril central (β/α)₇, o qual é estabilizado por duas pontes dissulfeto (Cys 19/ Cys 308 e Cys 185/ Cys 197). Baseado no alinhamento de seqüências e comparação estrutural com o alérgeno Api m 2 do veneno de abelhas foi proposto que, uma cavidade conservada, próxima ao centro ativo está envolvida na ligação do substrato. Epítomos de superfície e possíveis sítios de glicosilação foram comparados com seus homólogos de *Apis mellifera* e de *Dolichovespula maculata*, sugerindo que a reatividade cruzada entre Ves

v 2 e o alérgeno de *D. maculata* é muito maior que entre o de Ves v 2 e o alérgeno de *A. mellifera*.

Tanto a origem de novos genes por duplicações, como a geração de múltiplos produtos a partir de um gene através do processamento alternativo, têm sido documentado em numerosos exemplos. Adicionalmente, vários casos de genes dentro de outros genes, particularmente dentro de íntrons de outros genes tem sido descritos. Isto foi primeiramente mostrado, para o gene *Gart* de *Drosophila*, o qual contém um gene para a proteína da cutícula pupal em um de seus íntrons. Por último, poucos exemplos ainda são conhecidos, onde o local de iniciação de transcrição dentro do primeiro gene leva à formação de pequenos polipeptídeos conforme descrito acima para o MCD e a apamina (GMACHL; KREIL, 1995).

Desta forma, com base no exposto, a determinação da seqüência gênica do alérgeno hialuronidase, do veneno de *Polybia paulista* torna-se um assunto bastante interessante e relevante sobre vários aspectos e níveis desde o conhecimento básico até o aplicado, em diferentes áreas da ciência.

OBJETIVOS

3.0. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos específicos:

a) a determinação da seqüência de cDNA da enzima hialuronidase, um importante alérgeno do veneno de *Polybia paulista*, uma vespa urbana bastante agressiva e abundante no Estado de São Paulo, e cujo veneno apresenta elevada atividade miotóxica.

b) verificar a identidade da seqüência do alérgeno hialuronidase de *Polybia paulista* com seqüências da mesma enzima em outras espécies de vespas já depositadas no Banco de Dados e, com base na identidade destas seqüências:

- determinar as regiões conservadas importantes para a atividade enzimática;

- elaborar com base em modelos estruturais já descritos na literatura, a construção da estrutura tridimensional da enzima de *Polybia paulista* e determinar seus domínios, a região de interação com o substrato, a existência ou não de pontes dissulfeto e seus possíveis sítios de glicosilação, os quais devem estar relacionados a imunogenicidade da enzima;

- com base nesta estrutura, poder discutir as diferenças e similaridades existentes entre a enzima de *Polybia paulista* e aquelas já descritas.

Como objetivo geral teve-se:

Através da obtenção desta seqüência, este trabalho visou trazer subsídios importantes para estudos mais aprofundados sobre a imunogenicidade e atividade imunológica cruzada da hialuronidase de *Polybia paulista* com a enzima de outros vespídeos; a sua expressão e pesquisas sobre a possibilidade de utilização do alérgeno recombinante como antídoto específico aos efeitos nocivos do veneno em pacientes alérgicos com elevados níveis de IgE específico a este alérgeno; a determinação da seqüência da molécula precursora; da organização do gene, da busca de sítios de clivagem que possam levar ao entendimento dos mecanismos de maturação e regulação de sua atividade.

MATERIAL E MÉTODOS

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Após a identificação morfológica de alguns dos indivíduos de colônias de *Polybia paulista*, do município e arredores de Rio Claro - SP, foi feita a coleta utilizando-se éter para anestesiá-los. As vespas foram transportadas para o laboratório e, ainda vivas e anestesiadas, tiveram seus abdomens dissecados com bisturi, os quais foram prontamente utilizados nos experimentos de extração de RNA ou congelados a -85°C.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Desenho de iniciadores gene-específicos.

Inicialmente foi feita a busca de seqüências de nucleotídeos e/ou aminoácidos relativas ao alérgeno hialuronidase em venenos de vespas disponíveis no Banco de Dados – GenBank (website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Centro Nacional de Informação em Biotecnologia – NCBI). Essas seqüências foram alinhadas no programa Clustal W 1.8 para a verificação da existência de regiões conservadas, as quais foram essenciais para o desenho dos iniciadores gene-específicos.

Os alinhamentos resultantes foram então analisados, ou seja, as regiões de seqüências conservadas foram marcadas manualmente por sombreamento para melhor

visualização e os iniciadores desenhados de acordo com os requisitos básicos para maior eficiência das reações de PCR. Abaixo estão as sequências dos iniciadores de hialuronidase desenhados para a primeira fase da análise, além da sequência do iniciador Amp (adquirido da IDT Promega e que, se anela na sequência “adaptadora” adicionada em todos os genes durante a síntese da primeira fita de cDNA, descrita no item 4.2.3. adiante), os quais foram utilizados nas reações de RACE 3’:

H 1 – 5’ CATTATTGGAACGTTCTAC 3’

H 1R – 5’ GTAGGAGGAACGTTCCAATAAATG 3’

H 2 – 5’ CTTATTGGTGGTACGTGTATCAGGAC 3’

H 2R – 5’GTCCTGATACACGTACCACCAATAAG 3’

Amp – 5’ GGC CAC GCG TCG ACT AC 3’

Obs: os iniciadores H 1 e H 2 são diretos e H 1R , H 2R e Amp, reversos.

Para a obtenção da sequência completa do gene, através de processos de clonagem em diferentes vetores foram desenhados novos pares de iniciadores gene-específicos, sendo a um dos pares acrescentadas sequências específicas ao reconhecimento de enzimas de restrição na região 5’ (verificar sequências sublinhadas).

H Pa – 5’ ATGTGTCATTGTCCCCCGACT 3’

H Pp END – 5’ CTAAAAGTTCAGGGATGATCTTCT 3’

H Pa NCO I – 5’ GAA TCC ATG GCA ATGTGTCATTGTCCCCCGACT 3’

H Pp END NCO I – 5’ GAT CGG TAC CTAAAAGTTCAGGGATGATCTTCT 3’

Obs: os iniciadores H Pa e H Pa NCO I são diretos e os H Pp END e H Pp END NCO I reversos.

4.2.2. Extração de RNA.

O RNA total de *Polybia paulista* foi extraído conforme o método do TRIzol, (Life Technol, Cat. nº 15596), através de experimentos sempre feitos com material fresco, obtido logo após o momento da coleta do ninho, de duas maneiras diferentes: (a) RNA imediatamente extraído dos abdomens recém dissecados e macerados diretamente em Trizol, e (b) também com abdomens frescos, recém dissecados e macerados

diretamente em TRIzol, mas mantidos pré-incubados em freezer -85°C por 1 e por 7 dias, antes da extração final de RNA. Para cada experimento, em 500 mg do material foram adicionados 750 µL de TRIzol em tubo eppendorf, e posteriormente seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante.

A concentração do RNA total foi determinada através da razão de absorbância do produto final (diluído a 1:500 em H₂O-DEPC) em 260/280 nm e, a integridade do RNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose a 2% contendo formaldeído, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). O RNA obtido foi visualizado pela coloração do gel com brometo de etídeo a 0,001µg/mL.

4.2.3. Síntese da primeira e da segunda fita de cDNA

O “pool” de RNA foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA através reações de transcrição reversa com o kit Super Script da Gibco-life Technologies, nos quais utilizou-se cerca de 1µg de RNA juntamente com o iniciador poli dT – adaptador da Gibco-Life Technologies (de seqüência: 5’ GGC CAC GCG TCG ACT AC (T)₁₇ 3’), de acordo com as orientações do kit.

A 2ª fita de cDNA foi sintetizada por uma reação de PCR normal, a partir de testes e escolha do(s) melhor(es) iniciador(es) gene-específico que se anelava(m) à uma região 5’ interna do gene e do iniciador Amp de 17 pb (5’ GGC CAC GCG TCG ACT AC 3’) anelado ao final 3’ do gene, devido a sua complementaridade com a seqüência do poli dT- adaptador, utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA e portanto, incluída em todos os genes.

4.2.4. Amplificação de cDNA-gene específico e determinação da seqüência de cDNA do gene de hialuronidase através de reações de 3’ RACE-PCR.

As reações de amplificação dos fragmentos de interesse, próximos ao final 3’ foram realizadas testando-se um dos iniciadores gene-específicos diretos com o iniciador Amp reverso, ou combinações dos pares de iniciadores diretos/reversos, conforme descrito mais adiante. Para os demais fragmentos, foram utilizados iniciadores desenhados especificamente a cada fase do trabalho e objetivo dos experimentos.

Todas as reações foram realizadas utilizando-se a mistura “PCR Master Mix” (Promega) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante: 12,5 µL de “PCR Master Mix” (2X concentrado, contendo: 50 U/mL de Taq DNA polimerase, 400 µM de cada nucleotídeo e 3 mM de MgCl₂); 0,4 µM dos iniciadores; 1µL de cDNA, água MQ para o volume final de 25 µL.

As reações foram incubadas sob as seguintes condições:

- | | |
|--|--------|
| 1-Denaturação: 95°C, 2 min | } 40 X |
| 2-Denaturação: 95°C, 1 min | |
| 3-Anelamento: *47, 48, 50, 52,53 ou 55°C | |
| 4- Extensão: 72°C, 1 min | |
| 5- Extensão: 72°C, *5-15 min | |

(*) A temperatura de anelamento e o tempo de extensão variaram em função da otimização da reação, para cada par de iniciadores utilizados e para aumento do rendimento da reação.

Para otimização da quantidade de produto a ser obtido, foram testados os seguintes parâmetros: (1) temperatura de anelamento dos pares de iniciadores H 1/ H 2R, H1/Amp, H2/Amp, HPa / H Pp END (47°C, 48°C, 50°C, 52°C, 53°C e 55°C); HPa NCOI / HPpEND NCOI (48°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C); (2) quantidade de iniciadores utilizados (0,4 e 0,8µM) e (3) quantidade de cDNA (412,5, 825, 1650 ou 3300 ng). Nas situações em que as bandas obtidas com as reações de PCR mostravam-se ainda pouco intensas, foram realizadas reações de Re-PCR, onde se substituiu o cDNA por 0,5µL do produto de PCR (ou seja, do volume da primeira reação), adicionou-se os demais reagentes normalmente e elevou-se a temperatura de anelamento em cerca de 3°C, com o intuito de aumentar o rendimento das reações, sendo as demais condições de denaturação e extensão mantidas iguais ao da primeira reação de PCR.

Os fragmentos gerados (observados através de eletroforese) foram diretamente seqüenciados e posteriormente clonados.

4.2.5. Purificação dos produtos de PCR.

Os fragmentos de cDNA obtidos pelas reações de RACE, foram purificados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1X utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), conforme o protocolo sugerido pela empresa.

4.2.6. Reparo com T4 DNA polimerase.

Com o objetivo de reparar as extremidades geradas por adição de bases adenina pela Taq polimerase, durante as reações de PCR, foi realizado o reparo com T4 DNA Polimerase, segundo o protocolo descrito abaixo:

	Concentração Final
Tampão de enzimas de restrição (neste caso, foi usado o Tp NEB 10X)	1X
dNTPs	100 µM
T4 DNA Polimerase	0,6 U
DNA	200 ng

A reação foi então incubada 15 min a 12°C, 15 min a 75°C e posteriormente 2 min a 10°C para que o tubo fosse resfriado.

4.2.7. Análise dos sítios de restrição na seqüência completa do gene a ser clonado.

Anteriormente aos experimentos de clonagem da seqüência completa do gene e, com o objetivo de verificar se haviam dentro da seqüência, sítios de restrição que impediriam a clonagem, foram realizadas análises através de diferentes enzimas de restrição. As enzimas de restrição testadas foram Eco RI, Bam HI, SmaI, HindIII, NcoI, XbaI. As reações foram realizadas segundo o protocolo indicado para cada uma delas.

4.2.8. Clonagem.

4.2.8.1. Reação de ligação de DNA.

Os produtos de PCR contendo adenina nas extremidades das sequências - produzidos através da utilização da enzima Taq DNA polimerase - foram clonados em vetor p-GEM-T-Easy (Promega), vetor PUC 18 ou no vetor PET 302-Kan segundo o protocolo sugerido a cada um dos vetores e condições descritas nas **TABELAS I, II, III, IV e V.**

TABELA I – Condição utilizada para a clonagem do **fragmento de 800 pb.**

Vetor pGEM-T-Easy	Relação Inseto/Vetor	Tempo de incubação da reação de ligação	Tempo de incubação das placas
Condição	45/55 ng	30 min	24 h

TABELA II – Condição utilizada para a clonagem do **fragmento de 600 pb.**

Vetor pGEM-T-Easy	Relação Inseto/Vetor	Tempo de incubação da reação de ligação	Tempo de incubação das placas
Condição	40/60 ng	30 min	24 h

TABELA III – Condições testadas para a clonagem do gene completo ~ 1200pb.

Vetor pGEM-T-Easy	Relação Inseto/Vetor	Tempo de incubação da reação de ligação	Tempo de incubação das placas
Condição 1	55/45 ng	30 min	24 h
Condição 2	60/40 ng	120 min	72 h

TABELA IV – Condição testada para a clonagem do gene completo ~ 1200pb.

Vetor PUC 18	Relação Inseto/Vetor	Tempo de incubação da reação de ligação	Tempo de incubação das placas
Condição	60/40 ng	120 min	72 h

TABELA V – Condição utilizada para a clonagem do gene completo em vetor de expressão.

Vetor PET 302	Relação Inseto/Vetor	Tempo de incubação da reação de ligação	Tempo de incubação das placas
Condição	40/60 ng	120 min	24 h

4.2.8.2. Obtenção de bactérias competentes.

Células X11-Blue foram cultivadas em meio LB por 6 horas até a obtenção de $OD_{600} = 0,5$, sob agitação a 180 rpm, a 37°C. A cultura (1,5 mL) foi centrifugada por 4 minutos a 4000xg, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado de bactérias foi ressuspenso e homogeneizado em 1mL de $CaCl_2$ 50 mM gelado. O procedimento anterior foi repetido, centrifugando-se mais uma vez a cultura e por último o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de $CaCl_2$ a 50mM gelado para a obtenção das células competentes, as quais foram sempre mantidas em gelo durante o uso.

4.2.8.3. Transformação das bactérias.

Um volume de 50-150 μ L de células X11-Blue competentes e 3-15 μ L da reação de ligação (de acordo com as quantidades necessárias a cada um dos vetores) foram misturados em tubo falcon de 15 mL e mantidos em gelo pelo período de 30 min a 2h, seguido por um choque térmico de 42°C por 45 segundos e 2 minutos adicionais em gelo. Adicionou-se 100-400 μ L de meio LB às bactérias e incubou-se sob agitação a 37°C por 1 hora. As culturas foram plaqueadas em placas com meio LB / Ampicilina 100 μ g/mL / IPTG 100 μ M / X-Gal 100 μ g/mL (SAMBROOK *et al.*, 1989) para os vetores PGEM e PUC 18 e em LB/Ampicilina 100 μ g/mL para o vetor PET 302-Kan.

4.2.8.4. Análise das colônias recombinantes (brancas) por PCR.

Para determinar quais colônias apresentavam os fragmentos desejados inseridos nos plasmídeos, foi feita a análise por PCR com a mistura de reação “Master Mix” (Promega) segundo o protocolo sugerido pelo fabricante: 12,5 μ L de “PCR Master Mix” (2X concentrado contendo: 50 U/mL de Taq DNA polimerase, 400 μ M de cada nucleotídeo e 3 mM de $MgCl_2$), 0,5 μ L dos iniciadores universais direto e reverso (0,4 μ M de M_{13F} e M_{13R} , respectivamente), completando-se com água para o volume final de 25 μ L. A esta reação foram adicionadas as colônias brancas que foram retiradas da placa de cultura com palitos estéreis, sendo que o programa utilizado foi o mesmo das ampliações dos fragmentos.

4.2.9. Extração de DNA plasmidial (“mini-preps”).

Inicialmente, as culturas foram crescidas em 3 mL de meio líquido LB-ampicilina a 100 µg/mL a uma agitação de 225 rpm, a 37°C, durante 17 horas. Cerca de 1,4 mL das culturas foram transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas à velocidade de 4000 rpm durante 6 minutos a 20°C. O restante das culturas foi guardado em glicerol 50% em uma proporção de 1:1. Os sobrenadantes foram descartados por inversão dos tubos, as células ressuspensas e homogeneizadas em 500 µL de tampão GTE (Tris-HCl 0,26 M pH 7,4 glicose 0,92%, EDTA 0,1M pH 8,0) e este material foi novamente centrifugado na velocidade de 4000 rpm durante 6 minutos, sendo os sobrenadantes novamente descartados. Os precipitados foram homogeneizados em 80 µL do tampão GTE e posteriormente, alíquotas de 60 µL de cada suspensão foram transferidas para novos tubos e a elas foram acrescentados 60 µL de solução recém-preparada de NaOH 0,2 M /SDS 0,1% (5 mL de NaOH 4 M, 10 mL de SDS 10%, 85 mL de H₂O), sendo os tubos agitados por inversão. As amostras foram então incubadas por cerca de 10 minutos e centrifugadas por 3 minutos a 4000 rpm.

A seguir, cada suspensão recebeu 60 µL de KOAC gelado e, após inversão, 10 minutos de repouso e centrifugação de 6 minutos a 4000 rpm, cada preparação foi incubada durante 30 minutos a uma temperatura de 90°C. No final deste tempo, as preparações foram incubadas em gelo durante 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 4000 rpm durante 6 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos eppendorfs contendo 150 µL de isopropanol a 100%. Após uma nova centrifugação do material por 45 minutos à velocidade de 4000 rpm, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados por centrifugação com 200 µL de etanol a 70%. O excesso de etanol foi descartado por inversão dos tubos e o material (DNA plasmidial) foi seco por cerca de 1 hora à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensão em 25 µL de H₂O MQ estéril.

Ao final do processo, o material foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1 X (Tris-Acetato 0,04 M , EDTA 0,001 M) e visualizados pela coloração do gel com brometo de etídeo a 0.001 µg/mL. As amostras que apresentaram melhores resultados foram tratadas com RNase (a 20 µg/mL final) e incubadas a 37°C por 20 minutos.

4.2.10. Protocolo de PCR para sequenciamento.

O sequenciamento foi feito no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro-SP, através de reações terminadas com dideoxi nucleotídeos conforme o seguinte protocolo: 2,5µL de Big Dye Terminator, 2µL do tampão “Save Money” (Tris-HCl 0,2 M pH 9,0 contendo MgCl₂ 5 mM), 0,5 µL de iniciador (20µM), 150 a 200 ng de DNA (produto de PCR purificado ressuspensado em água pura) e H₂O MQ para o volume final de 10µL. Após breve centrifugação para mistura dos reagentes, as reações foram incubadas em termociclador segundo o programa:

- a) 96°C, 90 segundos;
- b) 96°C, 12 segundos;
- c) 50°C, 6 segundos;
- d) 60°C, 4 minutos;
- e) 24 ciclos dos passos b, c e d
- f) 4°C ∞

4.2.11. Purificação com isopropanol.

Todo volume das reações de sequenciamento foi transportado para novos tubos contendo 80 µL de isopropanol a 75% e deixados por 15 minutos, em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A seguir, o material foi submetido à centrifugação de 25 minutos a 15000xg e o sobrenadante removido com auxílio de bomba a vácuo. Os tubos foram vertidos sobre papel absorvente por dois minutos e após este tempo, acrescidos de 200µL de etanol 80% com posterior inversão dos tubos por várias vezes para lavagem das paredes. Em seguida, eles foram centrifugados por cinco minutos a 15000xg, escorridos em papel absorvente por alguns minutos e invertidos, ao abrigo da luz, para secagem completa ao ar livre ou em centrífuga a vácuo. Após a secagem, o material (DNA) foi ressuspensado em Loading Dye (3µL de Blue Dextran 10µg/mL – EDTA 5 mM pH 8,0 em Formamida) e após denaturação de 3 minutos a 94°C, um volume de 1,5µL deste material foi aplicado no gel de sequenciamento.

4.2.12. Análise das seqüências através de pesquisas no Banco de Dados.

A partir da obtenção das seqüências e através do programa Clustal W 1.8 BCM Search Launcher-Multiple Sequence Alignments (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) e Multalign (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) foram feitos os alinhamentos das seqüências diretas e reversas encontradas para os mesmos fragmentos, tendo sempre em mãos a seqüência do vetor utilizado para a clonagem e a seqüência dos iniciadores utilizados na amplificação do fragmento. A partir das seqüências consenso, foram então realizadas as pesquisas de similaridade entre as seqüências de bases e de aminoácidos, aqui encontradas e as descritas no GenBank pelo programa NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para construir o modelo tridimensional da hialuronidase de *Polybia paulista*, foi utilizado o programa Modeller V 8.2. (SALI; BLUNDELL, 1993). Como molde foi escolhida a estrutura tridimensional da hialuronidase recombinante de *Vespula vulgaris* (rVesv2) (código PDB 2ATM), resolvida a 2.0 Å. Para validação do modelo foi utilizado o programa Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e, para visualização e edição das figuras foi utilizado o programa PyMol (DeLANO, 1993).

RESULTADOS

5.0. RESULTADOS

5.1. Extração de RNA total

O RNA representa uma estrutura muito instável, tornando o processo de extração restrito às condições especiais e, durante a execução deste trabalho, várias tentativas de otimização da extração de RNA total de *Polybia paulista* foram feitas, a fim de obtermos RNA de boa qualidade para o sucesso das reações de RACE.

Obtivemos então, concentrações variando de 1700µg/mL, (fator de 1,74 para a relação 260/280 nm) para as extrações de RNA feitas com material fresco logo após a coleta, até 2850 µg/mL, (fator de 2,15) para os experimentos realizados com material fresco e pré-incubado em TRIzol e mantido por 1 dia e 7 dias a -85°C antes do processo de extração de RNA, propriamente dito. Quando analisadas em gel de agarose, as amostras de RNA referentes ao 1º e 7º dias pré-incubadas em TRIzol a -85°C mostraram-se melhores, em relação àquelas referentes à extração imediata, como pode ser verificado na **FIGURA 1**, onde o arraste ou “nuvem” que se verifica representa por sua vez o RNA mensageiro e os demais RNAs menores.

Analisando-se os resultados da **FIGURA 1**, verifica-se que, com exceção da amostra 1 (material fresco macerado em TRIzol e mantido a -85°C por 7 dias), o RNA das duas outras amostras, pode ser considerado como parcialmente degradado, devido à inexistência da banda de 28s, demonstrando que ou o método de TRIzol necessita ser otimizado para invertebrados, ou ainda que, possivelmente estes insetos sejam possuidores de um elevado teor de RNases endógenas. Embora os resultados obtidos

com a extração de RNA tenham apontado a existência de degradação parcial do material nas amostras 2 e 3, decidimos pela continuidade dos experimentos com as três amostras e, análise posterior da qualidade do cDNA obtido através destas amostras.

5.2. Síntese do cDNA.

As reações de síntese de **cDNA** foram realizadas com aproximadamente 1 µg de RNA das 3 amostras mencionadas acima. Na **FIGURA 2**, analisando-se os dados obtidos através do perfil eletroforético em gel de agarose, nota-se que nas três situações ocorreu a formação de uma “nuvem” de produtos na região de 400-1200 pb onde, justamente deveriam ser encontradas as seqüências de cDNA de tamanho esperado. Desta forma, pudemos verificar que, para todas as amostras de RNA parcialmente degradadas ou não, os produtos gerados pela síntese de cDNA permitiram a obtenção de “pools” de fragmentos de cDNA de alto peso molecular, onde as seqüências esperadas para os genes de veneno poderiam ser encontradas.

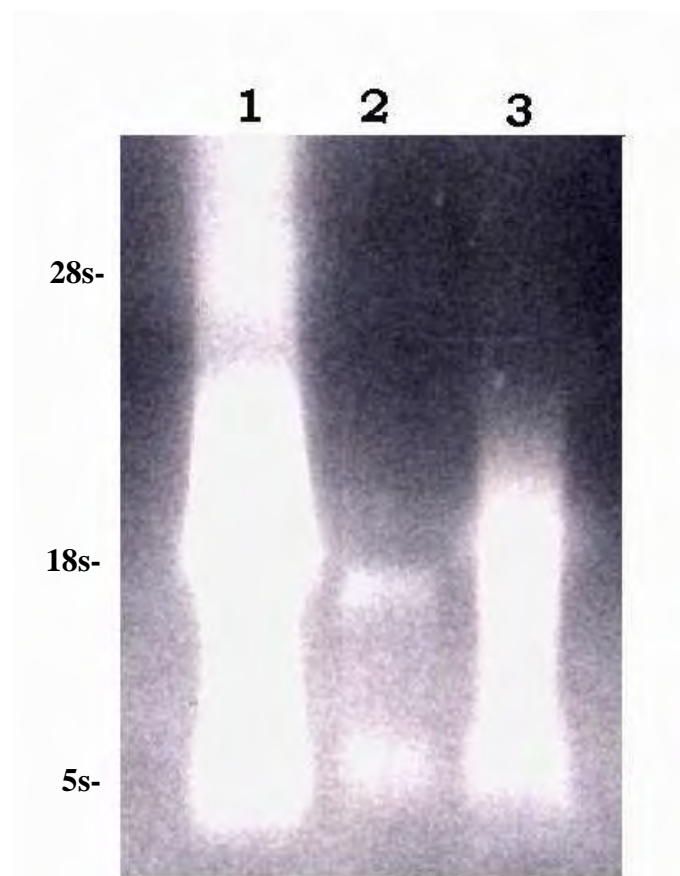


FIGURA 1. Perfil eletroforético de três amostras de RNA de *Polybia paulista*, em gel de agarose a 2% com formaldeído. Nas canaletas **1**, **2** e **3** foram aplicadas, respectivamente, as amostras de RNA referentes à extração do material depois de 7 dias em TRIzol a - 85°C, extração imediata do material fresco e de 1 dia após manutenção em TRIzol a -85°C.

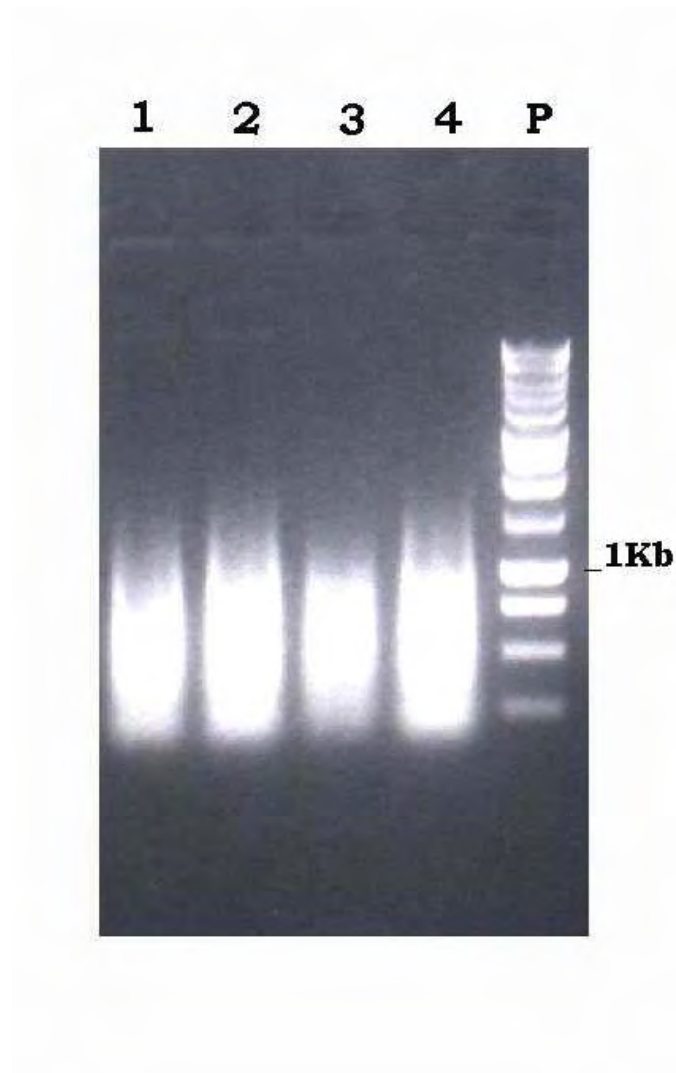


FIGURA 2. Perfis eletroforéticos de cDNA de *Polybia paulista*, em gel de agarose a 1% em TAE 1X. **P** corresponde ao padrão de DNA “ladder” de 250 pares de bases. As amostras **1** e **2** correspondem aos cDNAs sintetizados a partir das amostras de RNAs obtidas do material fresco e pré-incubado em TRIzol antes da extração por 1 e 7 dias a -85°C respectivamente, enquanto as amostras **3** e **4** referem-se ao cDNA sintetizado a partir de RNA extraído imediatamente do material fresco.

5.3. Amplificação de cDNA através de reações de RACE-PCR.

5.3.1. Influência da temperatura de anelamento e quantidade de iniciadores utilizados nas reações de RACE-3'.

Com relação à combinação dos iniciadores H1 e H2R, verificamos que a melhor temperatura de anelamento foi de 50°C, para a obtenção do fragmento de 800pb (localizado entre a região inicial 5' e o meio do gene de hialuronidase), sendo que nas demais temperaturas verificou-se a presença de uma banda muito fraca (em 47°C, 51°C e 52°C) ou nada foi amplificado (em 55°C).

A melhor concentração dos iniciadores e quantidade de cDNA para otimização e especificidade do fragmento desejado foram respectivamente de 0,4µM e cerca de 800 ng de cDNA, enquanto nas demais condições testadas muito pouco ou nenhum produto de interesse foi amplificado.

Quanto ao par de iniciadores H2 e Amp, os quais deveriam levar à obtenção de um fragmento de 600pb localizado na extremidade final 3' do gene de hialuronidase, a melhor temperatura de anelamento foi de 47°C (sendo que, nas demais temperaturas nenhum produto foi obtido). Mesmo utilizando-se 0.4 µM dos iniciadores e 3300ng de cDNA, naquela temperatura, a banda mostrava-se sempre muito fraca. Assim, para otimização do produto, este foi submetido a uma Re-PCR em que se substituiu o cDNA pelo produto de PCR obtido na primeira reação de amplificação e a temperatura de anelamento foi elevada para 50°C, tornando desta forma esta segunda reação mais específica.

Contudo, em nenhuma temperatura testada conseguimos obter um resultado satisfatório para a combinação dos iniciadores H 1 e Amp (fragmento a ser obtido de aproximadamente 1200 pb relativo à seqüência esperada para o gene completo de hialuronidase). Os produtos de amplificação foram analisados paralelamente a um padrão de DNA "ladder" de 100 pb, através de eletroforese em gel de agarose.

Os fragmentos decorrentes da amplificação pelo par **H1 / H2R** podem ser verificados na **FIGURA 3**, onde se observa uma banda de aproximadamente 800 pb, enquanto os produtos decorrentes da amplificação por **H 2 e Amp** estão demonstrados

na **FIGURA 4**, onde observamos uma banda de 600 pb, ambas correspondentes à seqüência de cDNA de tamanho esperado para estas combinações de iniciadores.

5.4. Purificação dos produtos da PCR.

Em vista do fato de que as reações de amplificação foram específicas de modo a serem observadas bandas únicas nos géis, os fragmentos de cDNA obtidos foram purificados diretamente das reações de PCR. O resultado pode ser verificado na **FIGURA 5**.

5.5. Sequenciamento Direto e Clonagem dos Produtos amplificados.

Os fragmentos resultantes da purificação foram então diretamente seqüenciados para uma confirmação prévia de que eles eram correspondentes às seqüências gênicas de nosso interesse. O sequenciamento foi realizado utilizando-se os mesmos iniciadores das reações de RACE 3' (H1 e H2R para o fragmento de 800pb e H2 e Amp para o fragmento de 600 pb). As seqüências obtidas estão apresentadas na **TABELA I**.

Com o objetivo de certificação das seqüências obtidas, foi realizada a clonagem destes fragmentos, de acordo com **Mat. e Mét. Item 4.2.8**. Após terem sido estabelecidas as melhores condições das reações de RACE-PCR conforme descrito anteriormente, foram feitas reações em maior volume (4X o usual) e estes produtos foram novamente purificados e clonados.

Os fragmentos foram clonados no vetor p-GEM-T Easy, cujo esquema está demonstrado na **FIGURA 6**. Após a clonagem dos fragmentos correspondentes aos pares de iniciadores H1/H2R e H2/Amp foram obtidas, após o crescimento da cultura, cerca de 16 e 7 colônias recombinantes respectivamente. Para se determinar quais destas colônias recombinantes apresentavam, de fato, o fragmento desejado inserido nos plasmídeos, foram feitas reações de PCR utilizando-se como molde de reação, o DNA das mesmas colônias (**FIGURAS 7 e 8**) as quais, foram palitadas da placa de cultura, além de reações de Mini-preps para purificação e análise do DNA plasmidial.

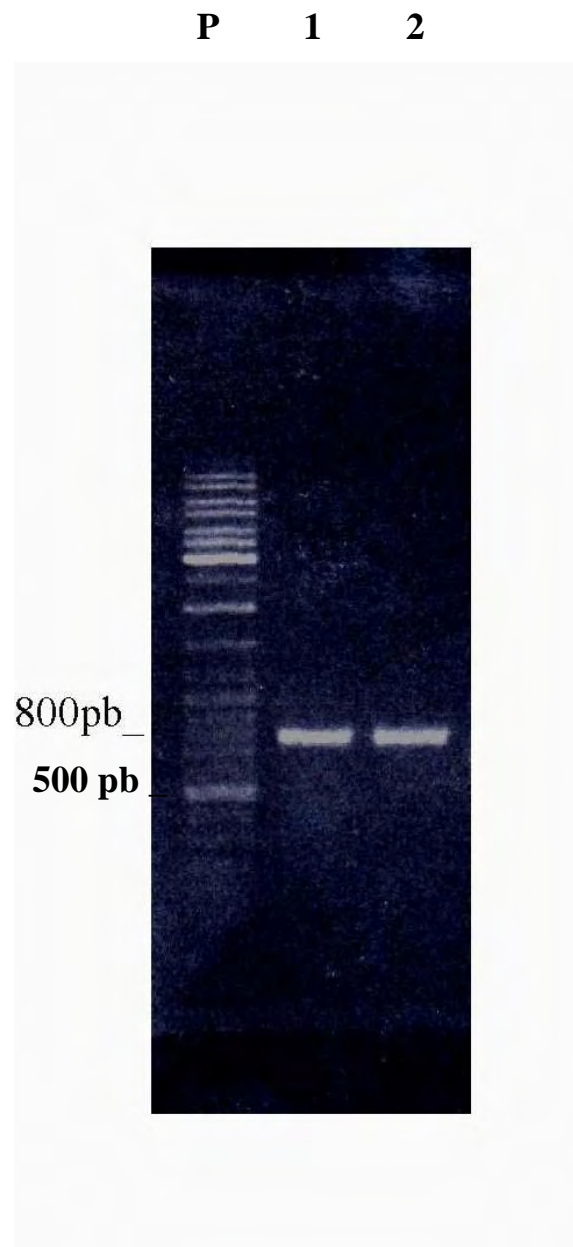


FIGURA 3. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X para os fragmentos amplificados com os iniciadores **H1 / H2R**. Da esquerda para a direita **P** refere-se ao DNA “ladder” de 100pb. Observar nas canaletas 1 e 2 a banda correspondente a 800 pb, equivalente ao fragmento desejado.

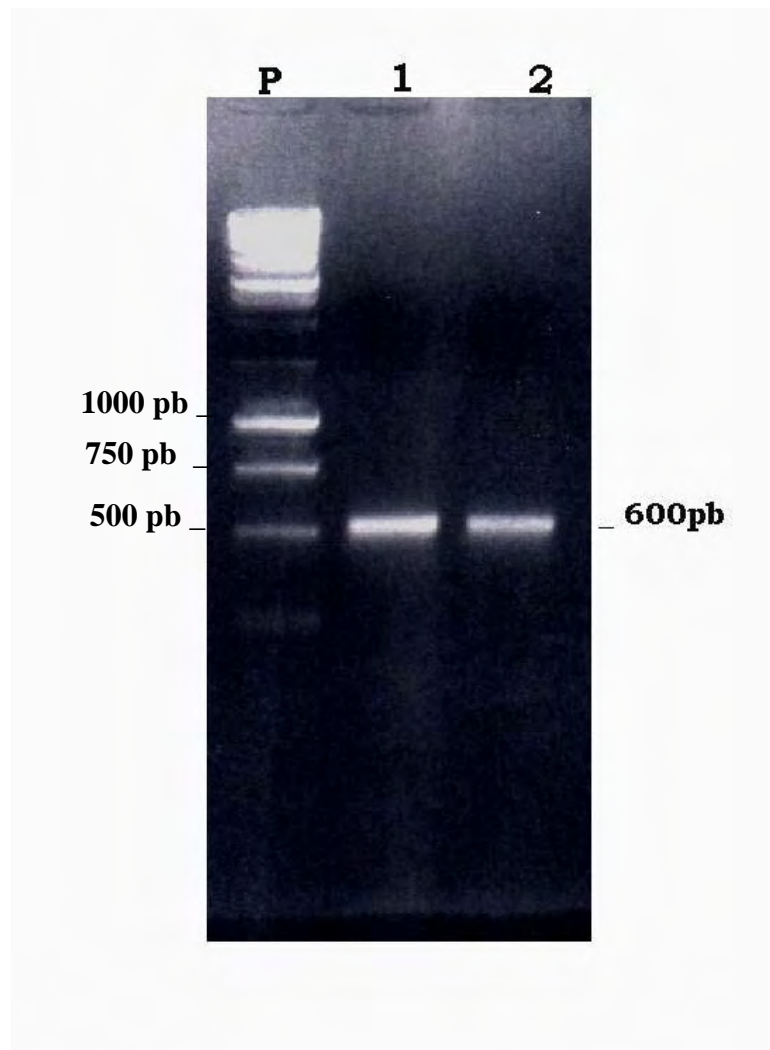


FIGURA 4. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x para o fragmento amplificado com os iniciadores **H2 / Amp**. Da esquerda para a direita **P** refere-se ao DNA “ladder” de 250 pb. Observar nas canaletas 1 e 2 a banda correspondente a 600 pb, equivalente ao fragmento desejado.

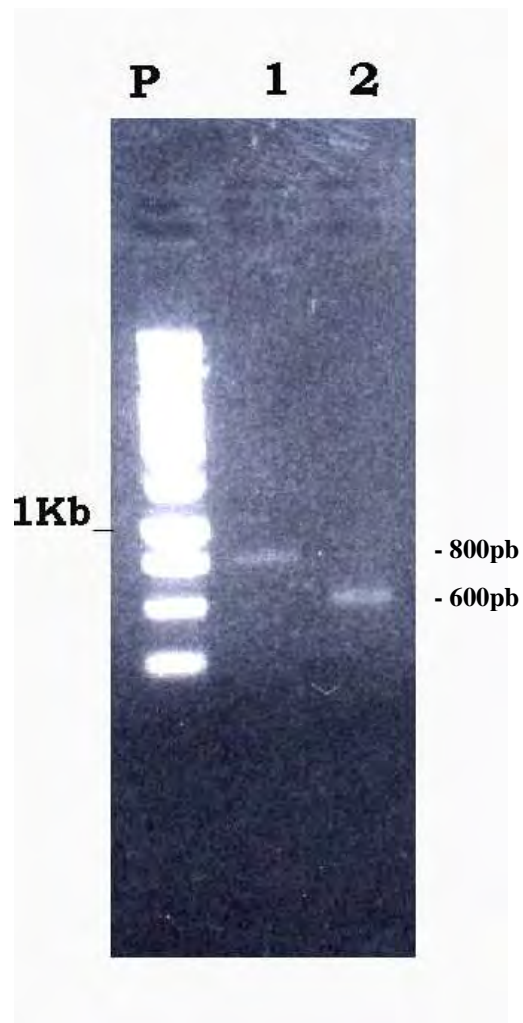


FIGURA 5. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x para os fragmentos decorrentes da purificação direta das reações de PCR realizadas com os pares de iniciadores H1/H2R - canaleta 1- banda correspondente a 800 pb e H2/Amp - canaleta 2- banda correspondente a 600 pb. Da esquerda para a direita **P** refere-se ao DNA “ladder” de 250pb.

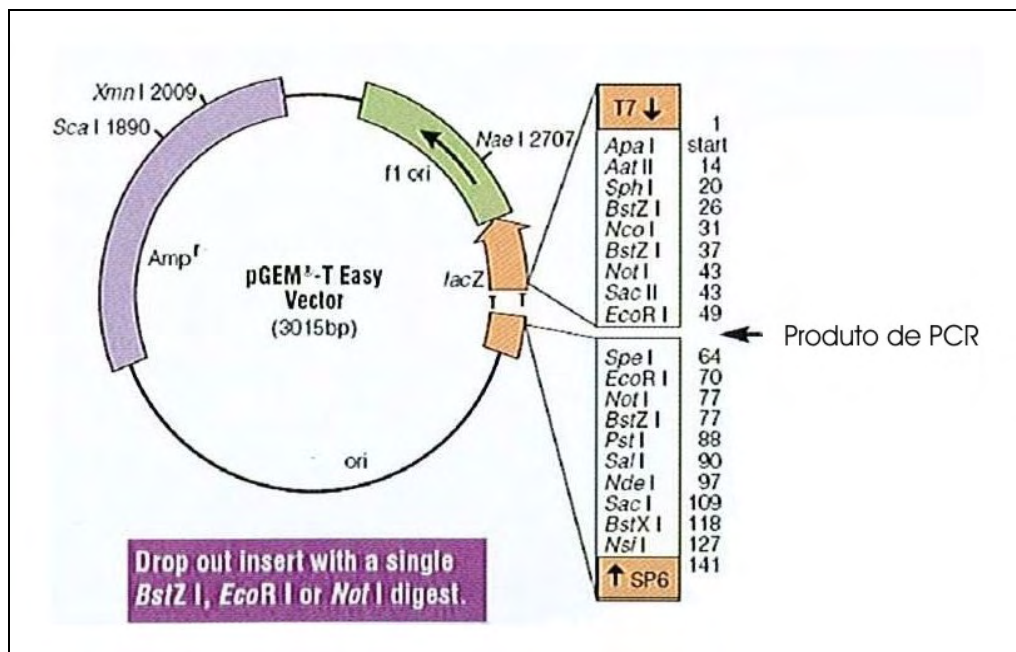


FIGURA 6. Esquema do vetor pGEM-T Easy da Promega, utilizado na clonagem das seqüências obtidas, mostrando o sítio de clonagem, o qual pode ser clivado por diferentes enzimas de restrição.

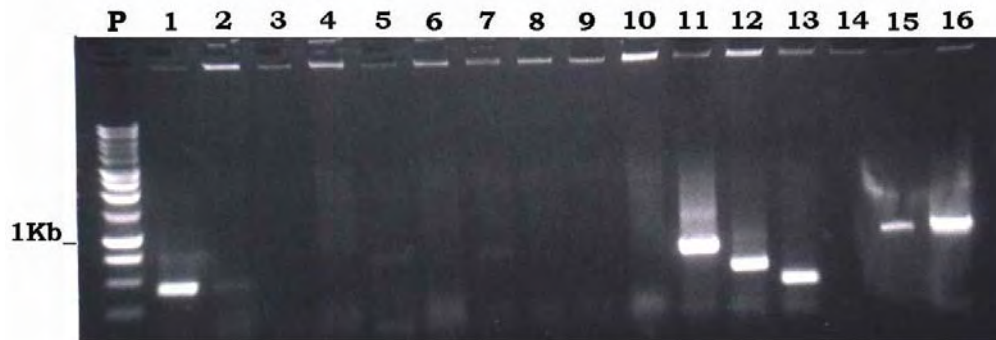


FIGURA 7. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x mostrando o resultado da análise por PCR direto das colônias com os iniciadores M_{13F} e M_{13R} , em que, se obteve o fragmento de 800 pb nas canaletas 11, 15 e 16. Da esquerda para a direita **P** refere-se ao DNA “ladder” de 250pb.

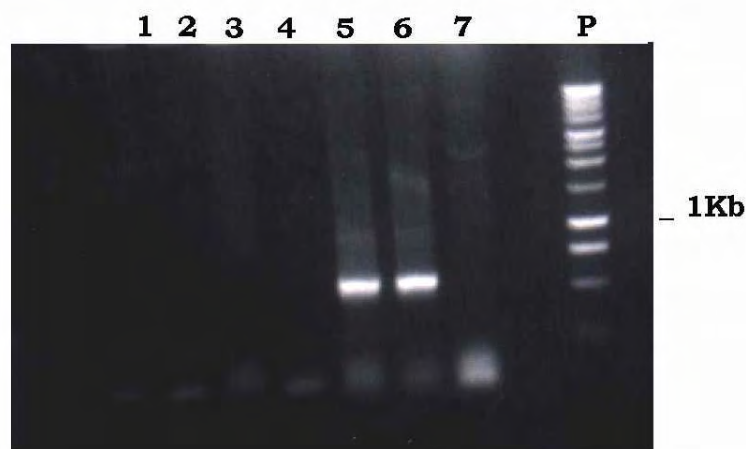


FIGURA 8. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x, mostrando o resultado da análise por PCR direto das colônias com os iniciadores M_{13F} e M_{13R} , em que se obteve o fragmento de 600 pb, nas canaletas 5 e 6. Da esquerda para a direita **P** refere-se ao DNA “ladder” de 250pb.

As amostras 11, 15 e 16 para o fragmento de 800 pb e as amostras 5 e 6 para o fragmento de 600 pb foram selecionadas para a realização das mini-preps, tendo-se em vista a maior intensidade e pesos moleculares correspondentes ou muito próximos aos dos fragmentos desejados.

Os 5 clones totais obtidos para ambos os fragmentos foram então seqüenciados. O sequenciamento foi realizado utilizando-se os iniciadores M13_F (direto) e M13_R (reverso) e as seqüências obtidas estão apresentadas no quadro seguinte.

<p>FRAGMENTO 800 pb (H 1/H2R): 5'-3'</p> <p style="text-align: center;">SEQUENCIAMENTO DIRETO 5'-3'</p> <p>GGGAATATCAAACCTAATTCTACCGACAATTTTCGCGGTGAAACTTTAGC AATTTATTATGATCCTGGAACTTCCCAGTTTGGATACCGTCAATAATG GCAAAATATAAGGAAAGAAACCGGTGGAGTTCTCAGCGAGTAATATCACG ATACATTTGCAACAATTTAACGAAGATTTGGATAAAATGACTCCGGATAA AAGCTTCGGTGGTATCGGTGTGATCGATTTCGAAAGATGGAGACCGGTTT TTCGACAGAATGGGGTAACACGGAATAACATAAGGAATATTCTATTGAA CTCGTTTCGAAAGAACATCAAAGTGGAGCAAAATCGATGATCGAAGCGGA AGCTACGAAAAGTTTCGAGAAATATGCCAGATACTTCATGGAAGAACTT TGAATTTGGCGAAAAGACTAGGAAAAGAGCTAAATGGGGTTATTACGGA TTTCCTTACTGCTATAATGCATCACCGAATAATCCTGGCCGAGTTGTGA TGCCAAAGCGATAAATCGAGAACGATAGAATGTCTGGTATACAATAATC AAGAAATCCTTTTACCATCCGCTACGTAAGACACAAACAGGGACCCGGA GGAAAGGATTTACTTAGTCAAGGAAGAGTTAAGGAAGCTGTTAGGGTAT CAACAATTTAGAATTCACCTAGTGTGCTTCCATTATG</p>	<p>FRAGMENTO 600 pb(H2/ Amp): 5'-3'</p> <p style="text-align: center;">CLONES</p> <p>H1_11_M13F: 730 pb 5'-3'</p> <p>TGGAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCGACGTGCGATGCTCCC GGCCGCCATGGCCGCGGGATCATTTATTGGAACTTCTTACCTTTATGTG TACCAATATGGCATAAAATTCGACGAAAGTGCAGATTTTAAATCAAAC ATAATTTAAGGACAATTTTCGCGGTGAACTTTAGCAATTTATTATGAT CCTGGAACCTTCCCAGCTTTGATACCGTCAATAATGGCAAATATAAGGA AAGAAACGGTGGAGTTCTCAGCGAGGTAATATCACGATACATTTGCAAC AATTTAACGAAGATTTGGATAAAATGACTCCGGATAAAAGCTTCGGTGGT ATCGGTGTGATCGATTTCCGAAAGATGGAGACCGGTTTTCGACAGAATTG GGTAACACGGAATACATAAGGAATATTCTATTGAACTCGTTCGCAAAG AACATCCAAAGTGGAGCAATCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAG TTCGAGAAATATGCCAGATACTTCATGGAAGAACTTTGAAATTTGGCGA AAAAGACTAGGAAAAGAGCTAAAATGGGGTTATTACGGATTTCTTACTGC TATAATGCATCACCGAATAATCCTGGCCGAGTTGTGATGCCAAGCCGA TAATTCGAGAAACCAATAGAATGTCTGGTATGGTCAATAATCAAGAAAAT CCTTTTACCATCCCGCTACGTTAAGACA</p> <p>>H1_15_M13F: 706pb 5'-3'</p> <p>CGAATTGGGCCGACGTGCGATGCTCCCGCCGCCATGGCCGCGGGATT ATTTATTGGAACGTTCTTACCTTTATGTGTCACCAATATGGCATAAATTT CGACGAAGTGCAGATTTTAAATCAAACATAATTTAAGGACAATTTTC CGGTGAAACTTTAGCAATTTATTATGATCCTGGAACCTTCCCAGCTTTG ATACCAGTCAATAATGGCAAATATAAGGAAAGAAACCGTGGAGTTCTTCA GCGAGGTAATATCACGATACATTTGCAACAATTTAACGAAGATTTGGATA AAATGACTCCGGATAAAACTTCGGTGGTATCGGTGTGATCGATTTGAA AGATGGAGACCGGTTTTCGACGAACTGGGGTAACACGGAATAACATAA GGAATATTCTATTGAACTCGTTCGCAAAGAACATCCAAAGTGGAGCAAA TCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAGTTTCGAGAAATATGCCAGATA CTTCATGGAAGAACTTTGAAATTTGGGCAAAAAGACTAGGAAAAGAGCT AAATGGGGTTATTACGGATTTCTTACTGGCTATGAATGCATTCACCGA ATTATCCCTGGCCGAGTTTGTGGATTGCCCAAAAGCGGATTCATTCCGA GAACCAATTAGAAATGGTCTTTGGGATGGTTCCAATAAAATCCAANAAA AATTCC</p> <p>>H1_16_M13F: 715pb 5'-3'</p> <p>ATAGGGCGAATTGGGCCGACGTGCGATGCTCCCGCCGCCATGGCCGCG GGATTCAATTTATTGGAACTTCTTACCTTTATGTGTCACCAATATGGCAT AAATTTTCGACGAAGTGCAGATTTTAAATCAAACATAAATTTAAGGACA ATTTTCGCGGTGAAACTTTAGCAATTTATTATGATCCTGGAACCTTCCCA GCTTTGATACCGTCAATAATGGCAAATATAAGGAAAGAAACCGTGGAGT TCTCAGCGAGGTAATATCACGATACATTTGCAACAATTTAACGAAGATT TGGATAAAATGACTCCGGATAAAAGCTTCGGTGGTATCGGTGTGATCGAT TTCGAAAAGATGGAGACCGGTTTTCGACAGAATTGGGGTAACACGGAAT ACATAAGGAATATTCTATTGAACTCGTTCGCAAAGAACATCCAAAGTGG GCAAAATCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAGTTTCGAGAAATATGCC AGATACTTCATGGAAGAACTTTGAAATTTGGGCGAAAAGACTAGGAAA GAGCTAAATGGGGTTATTACGGATTTCTTACTGGCTATAATGCATCAC CGAATAATCCTGGCCGAGTTGGTGTGATGCCAAAGCGATAATCCGAGAAG ATAGAATGTCTGGGATTTCAATAATCAAGAAAATCCCTTACCATCC GGCTACGTAAGACC</p>
<p>H1_11_M13F: 730 pb 5'-3'</p> <p>TGGAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCGACGTGCGATGCTCCC GGCCGCCATGGCCGCGGGATCATTTATTGGAACTTCTTACCTTTATGTG TACCAATATGGCATAAAATTCGACGAAAGTGCAGATTTTAAATCAAAC ATAATTTAAGGACAATTTTCGCGGTGAACTTTAGCAATTTATTATGAT CCTGGAACCTTCCCAGCTTTGATACCGTCAATAATGGCAAATATAAGGA AAGAAACGGTGGAGTTCTCAGCGAGGTAATATCACGATACATTTGCAAC AATTTAACGAAGATTTGGATAAAATGACTCCGGATAAAAGCTTCGGTGGT ATCGGTGTGATCGATTTCCGAAAGATGGAGACCGGTTTTCGACAGAATTG GGTAACACGGAATACATAAGGAATATTCTATTGAACTCGTTCGCAAAG AACATCCAAAGTGGAGCAATCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAG TTCGAGAAATATGCCAGATACTTCATGGAAGAACTTTGAAATTTGGCGA AAAAGACTAGGAAAAGAGCTAAAATGGGGTTATTACGGATTTCTTACTGC TATAATGCATCACCGAATAATCCTGGCCGAGTTGTGATGCCAAGCCGA TAATTCGAGAAACCAATAGAATGTCTGGTATGGTCAATAATCAAGAAAAT CCTTTTACCATCCCGCTACGTTAAGACA</p>	<p>H2_8_M13F: 718pb 5'-3'</p> <p>TATAGGGCGAATTGGGCCGACGTGCGATGCTCCCGCCGCCATGGCCGC GGGATTTCTTATGGTGGTACGTGATCAGGACGAAATGGAGATTTTCCCTA AGCGAGACCGACGTGAAAAGACTTCCAAAGAGATGACTAATTTGGTGG GGATGGTATCATAAATATGGGGTAGCTCGTCCGATGTAACAGCCTAAGTA AATGTAAGAGATTGAGAGTACCTGTTAAACACTTTAGGACCGATCGCG GTTAATGTAACAGAAACCGTCAACAGAAAGATCATCCCTGAACTTTTAGGA CAATCAATAACGCTTTGTCGATGTTGATAGGGTGTTCGGTGTACTCACT GAAAAGACTTCTTATAAAATAGCGCAAAAGAAAACCTGTAATTTATAAGTTC AAAATCTATGCAACCAAAGAAAGAAAATAATGAATAATCTAATCAGTTAA TCATAAGAAATCAACCAAAGAAAGAAATACCAACTCATCGTTTATGTTGAC TTAATCTAATTTGTTGTAATTAAGTCAATAGATGAATCGAATCGCGCT GAAATGCAATACTCTTAAAAAAGAGGAAAGAAAGAAAGTAAAGTGCAGCG GTGGCAATCACTAATGCGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGGAGAGC TCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTTGAGTTTCTATAGGGGTCCCTAAA TAGCTGGCGTAATCATC</p>
<p>>H1_15_M13F: 706pb 5'-3'</p> <p>CGAATTGGGCCGACGTGCGATGCTCCCGCCGCCATGGCCGCGGGATT ATTTATTGGAACGTTCTTACCTTTATGTGTCACCAATATGGCATAAATTT CGACGAAGTGCAGATTTTAAATCAAACATAATTTAAGGACAATTTTC CGGTGAAACTTTAGCAATTTATTATGATCCTGGAACCTTCCCAGCTTTG ATACCAGTCAATAATGGCAAATATAAGGAAAGAAACCGTGGAGTTCTTCA GCGAGGTAATATCACGATACATTTGCAACAATTTAACGAAGATTTGGATA AAATGACTCCGGATAAAACTTCGGTGGTATCGGTGTGATCGATTTGAA AGATGGAGACCGGTTTTCGACGAACTGGGGTAACACGGAATAACATAA GGAATATTCTATTGAACTCGTTCGCAAAGAACATCCAAAGTGGAGCAAA TCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAGTTTCGAGAAATATGCCAGATA CTTCATGGAAGAACTTTGAAATTTGGGCAAAAAGACTAGGAAAAGAGCT AAATGGGGTTATTACGGATTTCTTACTGGCTATGAATGCATTCACCGA ATTATCCCTGGCCGAGTTTGTGGATTGCCCAAAAGCGGATTCATTCCGA GAACCAATTAGAAATGGTCTTTGGGATGGTTCCAATAAAATCCAANAAA AATTCC</p>	<p>>H2_8_M13R: 690pb 5'-3'</p> <p>CTAGGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAG CTCTCCCATATGGTGCAGCTGCAGCGCGCCGACAGTGTGATGGCCACGC GTCGACTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGGATATGCAATTTACGC GCGATTTCGATCATCTAGTACTTAAATTAACAACAAAATAGATTAGTA CAAACATGAACGATGAGTTGGTATTTCTTCTTTGGTTGATTTCTATGATTA ACTGATTAGATTATTCATTTTCTTTCTTTGGTTGCATAGATTTTGAA CTTATAAAATTACAGTTTCTTTGCGCTTATTATAAGAAGTCTTTTCAGT GATATCACCGAACCCCTAATCAACATCGACAAAGCGTTATGATTGTCC TAAAAGTTCAGGGATGATCTCTGTTGACGGTTTCTGTTACATTAACCGC GATCGGTCTTAAAGTGTAAACAGTACTCTCTCAATCTCTTACATTTAC TTAGGCTGTTTACATCGGACGAGCTACCCCATATTATGATACCATCCCCA CCATGACTACTATCTTTGGAAAGTCTTTTTTACGTCGGTCTCGGTTAG GAAAATCTCCATTTTCGGTCTGATACAGTACCACCAATAAGAATCCCGC GGTCATGGCGGGCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCAATTCG</p>

5.6. Desenho de novos iniciadores para obtenção da seqüência completa do cDNA da hialuronidase do veneno de *Polybia paulista*.

A técnica de RACE-PCR está relacionada à amplificação rápida dos finais de cadeia da molécula de cDNA e também implica na amplificação de uma área entre dois iniciadores de seqüências gênicas conhecidas. O primeiro passo do RACE 3' é o desenho de iniciadores gene-específicos a partir de regiões bastante conservadas na molécula de interesse. Quanto mais conservada for a região eleita para o desenho dos iniciadores, maior será a chance de amplificação do fragmento esperado.

Através do sequenciamento destes fragmentos verificamos, conforme esperado, que pelo desenho dos iniciadores gene-específicos, o fragmento H1 realmente apresentou 800 pb e o fragmento H2, 600pb. Em vista de que, estes fragmentos H1 e H2 representam segmentos consecutivos do gene de hialuronidase de *Polybia paulista*, e apresentam uma seqüência de bases sobrepostas, foi possível, desta forma, desenhar novos iniciadores para a obtenção da seqüência completa do gene.

O desenho deste novo par de iniciadores, para obtenção da seqüência completa do gene de hialuronidase de *Polybia paulista*, foi possível pela (a) análise de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) que confirmou a correspondência destes fragmentos com o gene de hialuronidase de outras vespas, e ainda, (b) no alto grau de similaridade observado entre estes fragmentos com as seqüências finais e iniciais de *Polistes annularis*, espécie de maior similaridade com *Polybia paulista*.

Conforme esquematizado a seguir, nas **FIGURAS 9 e 10**, utilizamos um fragmento inicial da seqüência de hialuronidase de *Polistes annularis*, para servir como o iniciador direto (HPa) e um fragmento final da seqüência de hialuronidase de *Polybia paulista* (obtida previamente através do par H2/Amp), para obter o iniciador reverso complementar (HPpEND), os quais estão indicados por setas nas figuras.

HPa 5'→3' **TATGTGTCATTGTCCCCGACT**TCAGTATTTAATATCATCACCGATGACATCTCCCACCAAATCTTTCCAGATCGAATTG
 TGAAAGATCCAAAAGACCGAAAAGGGTCTTCAGCATTATTGGAACGTTCCCTACCTTTATGTGCCACCAATATGGCATGA
 ATTTTCGACGAGGTGACAGATTTAATATCAAACATAATTCTAAGGACAATTTTCGCGGTGAACTATATCAATTTATTAC
 GATCCTGGAAAATTTCCAGCATTGATGCCACTAAAAAATGGTAATTATGAGGAAAGAAACGGAGGGTTCCTCAGCGAGG
 TAACATCACGATACATTTGCAACAATTTAACGAAGATTTGGATAAAAATGACACCGGATAAAAAATTCGGTGGTATCGGTG
 TAATCGATTTCGAAAGATGAAACCGATTTTCCGACAGAATTGGGGTAACACGGAATACATAAGAAATATTCTATTGAA
 CTCGTTTCGAAAGAACATCCAAAGTGGAGCGAATCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAAGTTTCGAGAAATATGCGAG
 ATATTTTCATGGAAGAACTTTGAAATTGGCAAAAAAGACTAGGAAAAGGGCTAAGTGGGGTTATTACGGATTTCTTACT
 GCTATAACGTAACACCGAATAATCCTGGCCCGGATTGCGATGCTAAAGCGACAATCGAGAACGATAGACTGTCTGGATG
 TACAATAATCAAGAAATACTTTTCCATCCGCTACGTGAGACATGAACAAAAACCGAGGAAAGGGTTTACCTAGTGCA
 AGGTAGAATTAAGAAGCTGTTAGGATATCGAATAATTTAGAACATTCACCTAGTGTGCTTGCTTATTGGTGGTACGTGT
 ATCAGGACAAGATGGACATTTACCTAAGCGAGACCGGACGTGGAAAAGACTTTCCAAGAGATAGTGACTAATGGTGGGGAT
 GGATCATAATATGGGGTAGCTCGTCCGATGTTAACAGCCTAAGTAAATGTAAGAGATTGAGAGAGTACCTGTAAACAC
 TTTTAGGACCGTTTCGCGGTTAATGTAACAGAACTGTCAACGGAAGATCATCCCTAAACTTCTAAAATAATCGATAACGCC
 TAATCACGTCGATGATGATTATTAGGGTGTCTTCGGTGATTGGTTTGATCTCACTGAAAAGACTTTTCGTTAAAAACA
 AAAAGATAAATGTAATTTATAAGTTAAAAAACCTATACGACCAAAGAAAGAAAGAAAAA

FIGURA 9. Localização do iniciador desenhado para o cDNA da hialuronidase de *Polybia paulista* HPa: 5'ATGTGTCATTGTCCCCGACT 3'(seta) na seqüência do mesmo gene na vespa *Polistes annularis*, obtida do GenBank, número de acesso: (>gi|5815250|gb|AF174528.1|AF174528).

otimização do produto, este foi submetido a uma nova reação de Re-PCR em que foram utilizados 0,5µL do volume da primeira reação de PCR, como molde para a segunda reação e, a temperatura de anelamento foi elevada para 53°C, tornando desta forma esta segunda reação mais específica.

Os produtos de amplificação foram analisados paralelamente a um padrão de DNA de 250 pb, através de eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos decorrentes da amplificação e da re-amplificação pelo par **HPa e HPp END** podem ser verificados nas **FIGURAS 11 e 12**, onde se observa uma banda de aproximadamente 1200 pb, correspondente à seqüência de cDNA de tamanho esperado para a combinação destes iniciadores.

1ª Reação - PCR:

→ Temp. de anelamento dos iniciadores **HPa /HPp END** - 50°C

→ Concentração de iniciadores.....0,4 µM

2ª Reação - rePCR:

→Temp. de anelamento dos iniciadores **HPa / HPp END** - 53°C

→Quantidade de produto (1ª reação) utilizado.....0,5 µL

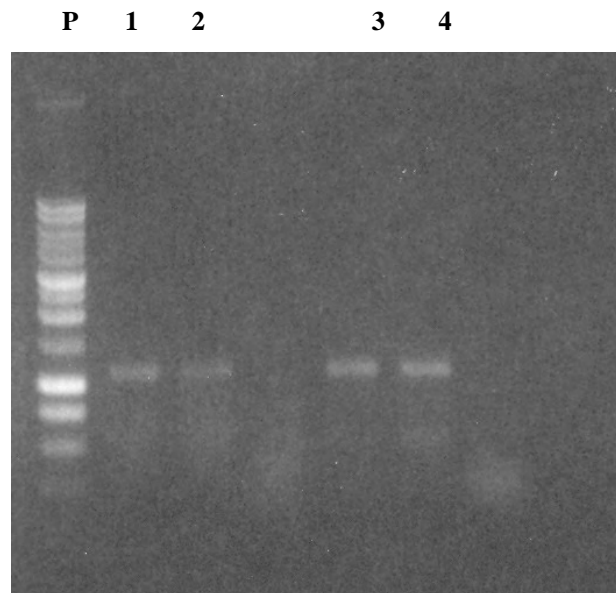


FIGURA 11. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, para os fragmentos amplificados com os iniciadores **HPa /HPp END** em diferentes condições de reação. Da esquerda para a direita **P** refere-se ao DNA “ladder” de 250pb. Observar nas canaletas **1 e 2, 3 e 4** as bandas resultantes do PCR nas temperaturas de anelamento a 48 e 50°C respectivamente, as quais são correspondentes a 1200 pb, e equivalentes ao fragmento desejado para o gene completo.

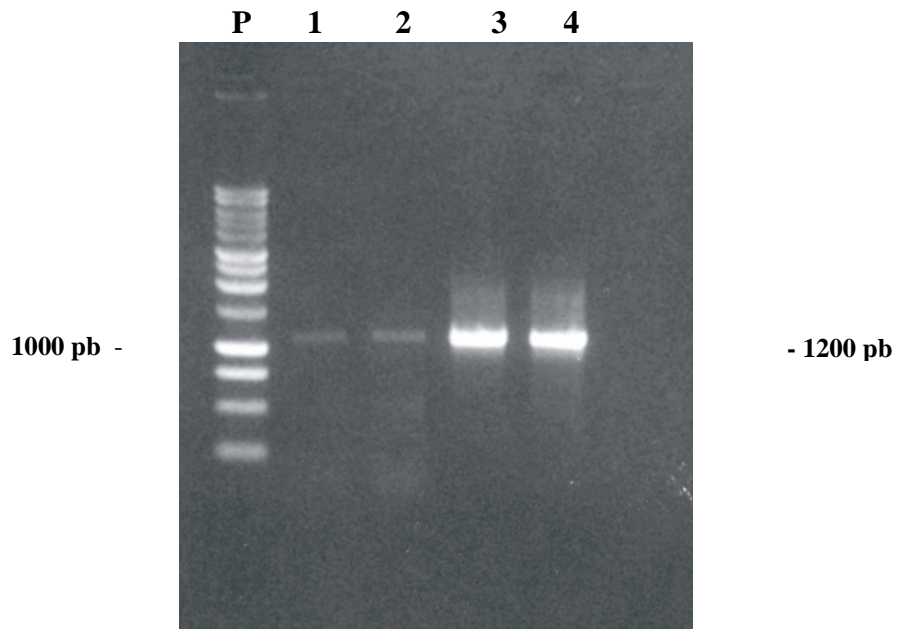


FIGURA 12. Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, mostrando a banda correspondente a 1200 pb, equivalente ao fragmento desejado para o gene completo de hialuronidase de *Polybia paulista*. Da esquerda para a direita **P** refere-se ao DNA “ladder” de 250pb. Observar nas canaletas **1** e **2** a menor intensidade da banda proveniente da primeira reação de PCR com temperatura de anelamento de 50°C e nas canaletas **3** e **4** a maior intensidade do mesmo fragmento obtido pela reação de Re-PCR na temperatura de anelamento de 53°C.

5.8. Purificação do produto de PCR.

Após terem sido estabelecidas as melhores condições da reação de RACE 3', conforme descrito anteriormente foi feita uma reação em maior volume (10X o usual) e este produto foi purificado diretamente da reação de PCR, com resultados não muito bons (não demonstrados) e também, submetido a eletroforese, cortado e eluído do gel de agarose para a purificação, conforme descrito no ítem **4.2.5. de Mat. e Mét. (FIGURA 13)**.

5.9. Clonagem do gene completo de hialuronidase.

A seguir, o fragmento purificado foi clonado no vetor p-GEM-T-Easy. As culturas obtidas foram plaqueadas em meio LB contendo Ampicilina/IPTG/X-Gal, e as colônias recombinantes foram selecionadas após o crescimento da cultura.

Em todos os experimentos de clonagem obtivemos colônias brancas (recombinantes) e colônias azuis (não recombinantes). Para se determinar quais das colônias recombinantes obtidas apresentavam o fragmento desejado inserido nos plasmídeos, foi feita uma reação de PCR utilizando-se como molde, o DNA de todas as mesmas colônias brancas, as quais foram palitadas da placa de cultura e diretamente utilizadas nas reações de PCR e, depois as colônias foram submetidas ao protocolo de reações para purificação do DNA plasmidial (mini-preps).

Nas primeiras tentativas com o vetor PGEM T-Easy, e em acordo com a primeira condição da **TABELA III** descrita em **Mat. e Mét. Item 4.2.8.1.** sempre obtivemos colônias brancas recombinantes, e verificamos através das mini-preps a presença de bandas plasmidiais de maior peso molecular, quando comparadas com o vetor intacto. No entanto, ao realizar o sequenciamento das amostras, verificamos que as seqüências correspondiam apenas àquela do vetor sozinho e não do gene desejado como esperávamos, indicando não ter ocorrido ligação do inserto ao plasmídeo. Assim, as colônias brancas obtidas indicavam a obtenção de falsos-positivos e, não colônias recombinantes, o que foi confirmado posteriormente, através de um maior tempo de incubação (3 dias a 4°C) das placas contendo as colônias, em que muitas das colônias brancas se tornaram azuis.

Nas várias tentativas de clonagem ainda no vetor PGEM-T-easy, de acordo com a segunda condição da **TABELA III**, onde a relação inserto/vetor, a incubação da reação de ligação e o tempo de incubação das placas foram aumentados, obtivemos em apenas um dos testes, colônias recombinantes, com um maior grau de confiabilidade em comparação aos experimentos realizados na primeira condição. Estas colônias supostamente recombinantes foram submetidas ao protocolo de mini-preps para a obtenção do DNA plasmidial e posterior sequenciamento. No entanto, as amostras seqüenciadas demonstraram, novamente, apenas a seqüência do vetor.

Paralelamente, foram feitos experimentos de clonagem no vetor PUC 18, tratado com a enzima de restrição Sma I (2,7 Kb) utilizando os parâmetros da segunda condição da **TABELA III**. Para isto, utilizamos a enzima T4 DNA polimerase para reparar a nossa seqüência de DNA nas extremidades, geradas pela TAq Polimerase durante as reações de PCR. No entanto, todas as colônias recombinantes obtidas e selecionadas para as mini-preps e posterior sequenciamento apresentaram também, somente a seqüência do vetor. Como uma terceira alternativa, tentamos inserir esta seqüência diretamente no vetor de expressão PET 302-Kan (4,3 Kb) (FERREIRA H., comunicação pessoal), com o objetivo de obtermos o alérgeno recombinante para futuros estudos. Já que a etapa de clonagem se mostrou bastante crítica em todos os experimentos, a fim de otimizar e facilitar a ligação do inserto no vetor, o mesmo foi cortado com a enzima de restrição NcoI, e o par de iniciadores **HPa** / **HPpEND** (direto e reverso, respectivamente) foram acrescidos da seqüência de reconhecimento desta mesma enzima. A seqüência deste par pode ser verificada abaixo, sendo que, a região grifada, em destaque, corresponde ao sítio de reconhecimento da enzima de restrição NcoI: **HPaNcoI- 5' GAT CGG TAC CTA AAA GTT CAG GGA TGA TCT TCT 3'**

HPpENDNcoI- 5' GAA TCC ATG GCA ATG TGT CAT TGT CCC CCG ACT 3'

Antes da escolha da NcoI, foram realizadas reações de digestão da seqüência de 1200 pb obtida, com as enzimas de restrição Bam HI, Eco RI, Hind III, Xba, Sma I e Nco I, para verificar se havia na seqüência do gene, sítios de restrição que impediriam a clonagem (**FIGURA 14**). Como nenhuma destas enzimas cortou a seqüência do gene de hialuronidase, optamos por utilizar a enzima Nco I disponível em maior quantidade no laboratório.

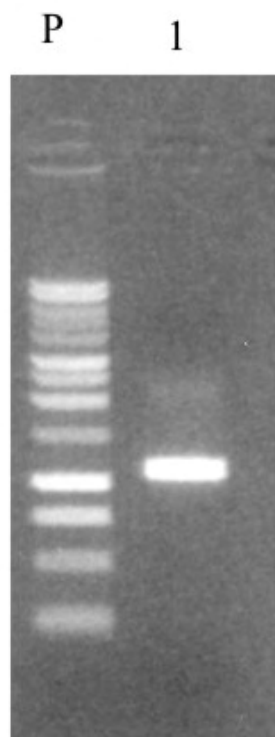


FIGURA 13. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X para alíquota do fragmento de 1200pb purificado (canaleta 1). **P** refere-se ao DNA “ladder” de 250pb.

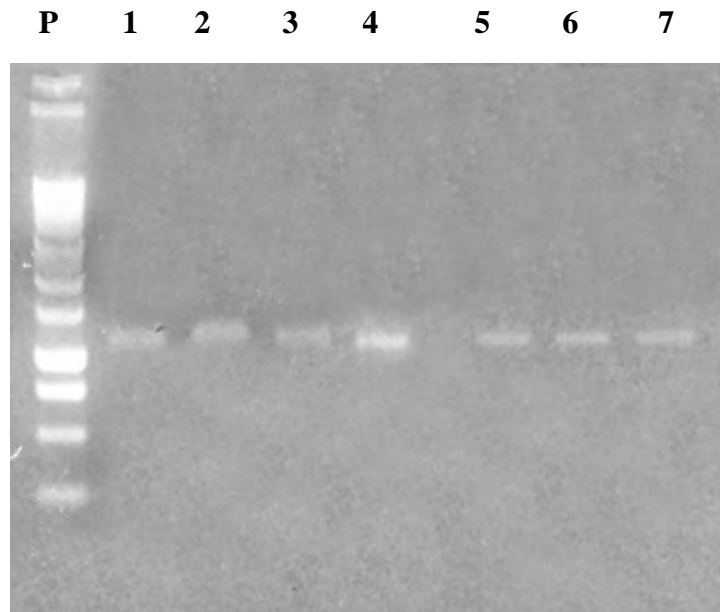


FIGURA 14. Resultado do processo de digestão da seqüência de 1200pb, correspondente ao alérgeno hialuronidase de *Polybia paulista*, com as enzimas de restrição: Bam H1 (1), Eco R1 (2), Hind III (3), Xba, (4), Sma I (5) e Nco I (6), fragmento de 1200 pb correspondente ao gene de hialuronidase (7) em gel de agarose a 1%. **P** representa o padrão de pesos moleculares “ladder” de DNA de 250pb. Observar que em nenhum dos casos houve corte da seqüência do gene de hialuronidase, sob as condições experimentais testadas.

Em todas as tentativas de clonagem neste vetor de expressão, infelizmente, também não ocorreu o crescimento de colônias nas placas, talvez devido a menor intensidade das bandas, ou seja, menor quantidade de DNA amplificado nas reações de PCR, utilizando os iniciadores **HPaNcoI** e **HPpENDNcoI**, quando comparado com as reações feitas com os iniciadores **HPa** e **HPpEND**, o que em consequência, pode ter dificultado sobremaneira, o processo da reação de ligação.

Em contrapartida a estes resultados, tais dificuldades não ocorreram no processo de clonagem dos fragmentos obtidos anteriormente (800 e 600 pb). Assim, os resultados negativos obtidos acima, talvez pudessem, inicialmente, ser explicados em função do tamanho do inserto entre 1000-1200 pb, correspondente ao gene inteiro da hialuronidase. Entretanto, esta hipótese não pode ser aceita frente a vários relatos da literatura sobre o sucesso de clonagem, nos mesmos vetores testados, de outros genes de mesmo tamanho, ou ainda maiores. Outras duas hipóteses seriam de que, por motivos ainda não esclarecidos, alguns genes sejam mais difíceis de serem clonados ou ainda, que a hialuronidase, poderia estar sendo tóxica à bactéria, pelo fato de ser uma enzima que degrada o ácido hialurônico, o qual é um constituinte da membrana. No entanto, em consulta à literatura recente, verificamos que no trabalho publicado por (SKOV *et al.*, 2006), o gene da hialuronidase da vespa *Vespula vulgaris* de 993 pb, foi clonado em *E. coli*, expresso e caracterizado bioquímica e estruturalmente.

Como, todas as nossas tentativas de clonagem falharam, optamos por realizar experimentos de sequenciamento direto do fragmento correspondente ao gene inteiro da hialuronidase, já que a banda mostrava-se única e intensa nos géis de agarose. As seqüências obtidas desses experimentos foram analisadas individualmente e também, principalmente em comparação com as seqüências já pré-determinadas dos fragmentos de 600 e 800pb. Desta forma, na **FIGURA 15** abaixo, podemos verificar a seqüência consenso do gene completo, proveniente do sequenciamento direto e dos dois fragmentos menores do gene.

5' CATTATTTGGAACGTTCTACCTTTATGTGTCACCAATATGGCATAAATTTTCGACGAAGTGA
 CAGATTTTAATATCAAACATAATTCTAAGGACAATTTTCGCGGTGAAACTTTAGCAATTTATTA
 TGATCCTGGAAACTTCCCAGCTTTGATACCAGTCAATAATGGCAAATATAAGGAAAGAAACGGT
 GGAGTTCTCAGCGAGGTAATATCACGATACATTTGCAACAATTTAACGAAGATTTGGATAAAA
 TGACTCCGGATAAAAAGCTTCGGTGGTATCGGTGTGATCGATTTTCGAAAGATGGAGACCGGTTTT
 TCGACAGAATTGGGGTAACACGGAAATACATAAGGAATATTCTATTGAACTCGTTCGCAAAGAA
 CATCCAAAGTGGAGCAAATCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAAGTTTCGAGAAATATGCCA
 GATACTTCATGGAAGAACTTTGAAATTGGCAAAAAAGACTAGGAAAAGAGCTAAATGGGGTTA
 TTACGGATTTCTTACTGCTATAATGCATCACCGAATAATCCTGGCCCCGAGTTGTGATGCCAAA
 GCGATAATCGAGAACGATAGAATGTCGTGGATGTACAATAATCAAGAAATCCTTTTACCATCCG
 TCTACGTAAGACACAAACAGGACCCGGAGGAAAGGATTTACTTAGTGCAAGGAAGAGTTAAGGA
 AGCTGTTAGGGTATCAAACAATTTAGAACATTCACCTAGTGTGCTTCCTTATTGGTGGTACGTG
 TATCAGGACGAAATGGAGATTTTCTAAGCGAGACCGACGTGAAAAAGACTTTCCAAGAGATAG
 TGACTAATGGTGGGGATGGTATCATAATATGGGGTAGCTCGTCCGATGTAAACAGCCTAAGTAA
 ATGTAAGAGATTGAGAGAGTACCTGTTAAACACTTTAGGACCGATCGCGGTTAATGTAACAGAA
 ACCGTCAACAGAAGATCATCCCTGAACTTTTAG 3'

FIGURA 15. Seqüência consenso do gene completo (991pb) de hialuronidase do veneno de *Polybia paulista* obtida através de sequenciamento direto e da análise das seqüências dos fragmentos de 600 e 800pb, conforme **Mat. e Mét. Item 4.2.10.**

5. 10. Análise da seqüência através de pesquisas no banco de dados

Após a obtenção da seqüência e através do programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) foram feitos o alinhamento desta seqüência com aquelas depositadas no Banco de Dados. O resultado mostrou que a seqüência de 991 pb apresentou maior identidade de nucleotídeos (93%) com *Polistes annularis* e menor identidade com as espécies *Vespula vulgaris* (81%), *Vespula germânica* (81%) e *Dolichovespula maculata* (80%).

O alinhamento de nucleotídeos, resultante desta seqüência, com as demais espécies citadas acima e também, só com *Polistes annularis*, a espécie de maior

identidade, podem ser verificados nas **FIGURAS 16 e 17**, respectivamente. Na **FIGURA 18** podemos observar, através do cladograma, a similaridade entre todas as espécies citadas, baseado em suas respectivas seqüências de cDNA do alérgeno de veneno - hialuronidase.

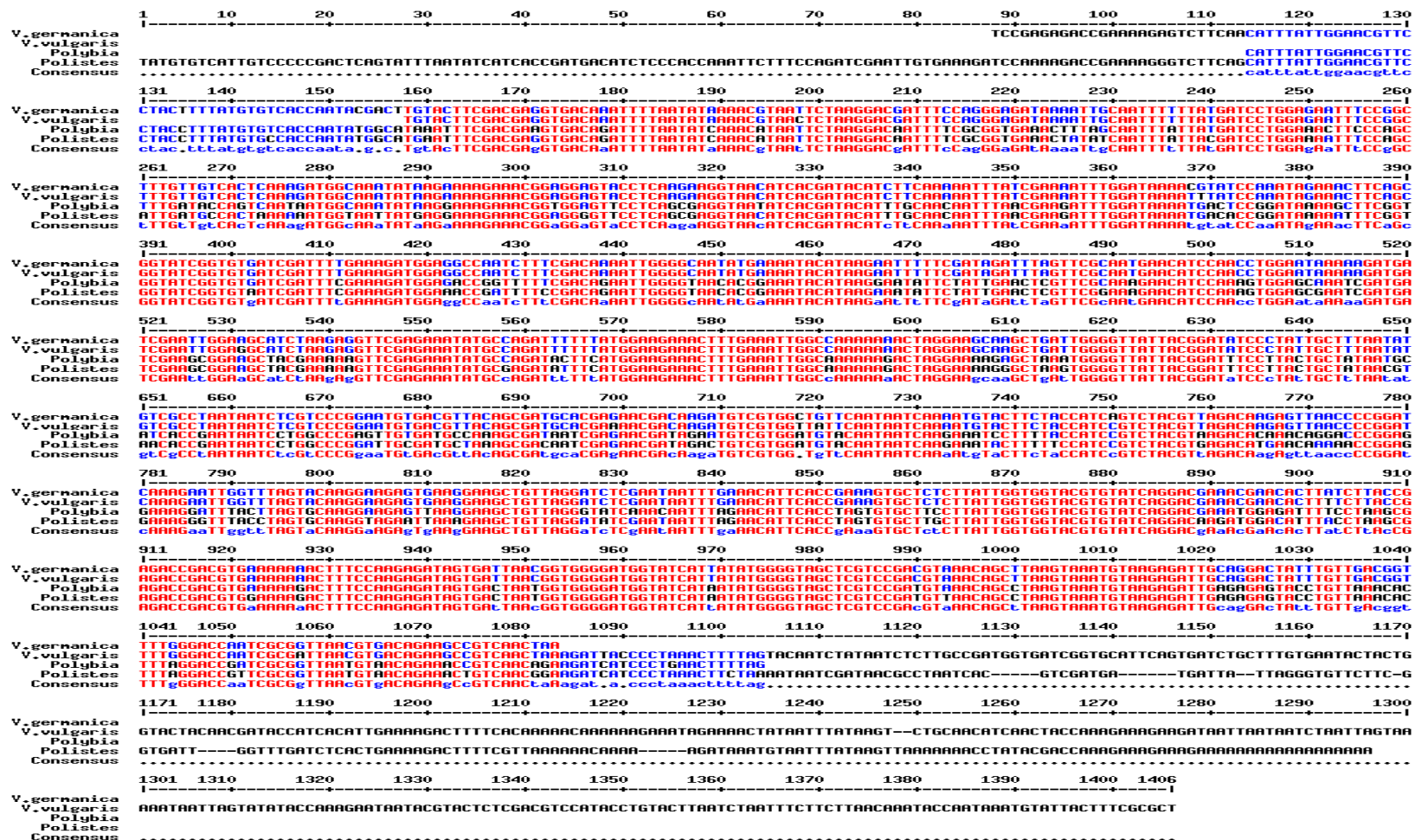


Figura 16. Alinhamento das seqüências de cDNA das hialuronidasas de *Polybia paulista* e de outras vespas das espécies de *Vespula germânica*, *Vespula vulgaris* e *Polistes annularis*, mostrando a grande similaridade (regiões em vermelho) entre estas espécies. Análise realizada pelo Programa Multalign (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

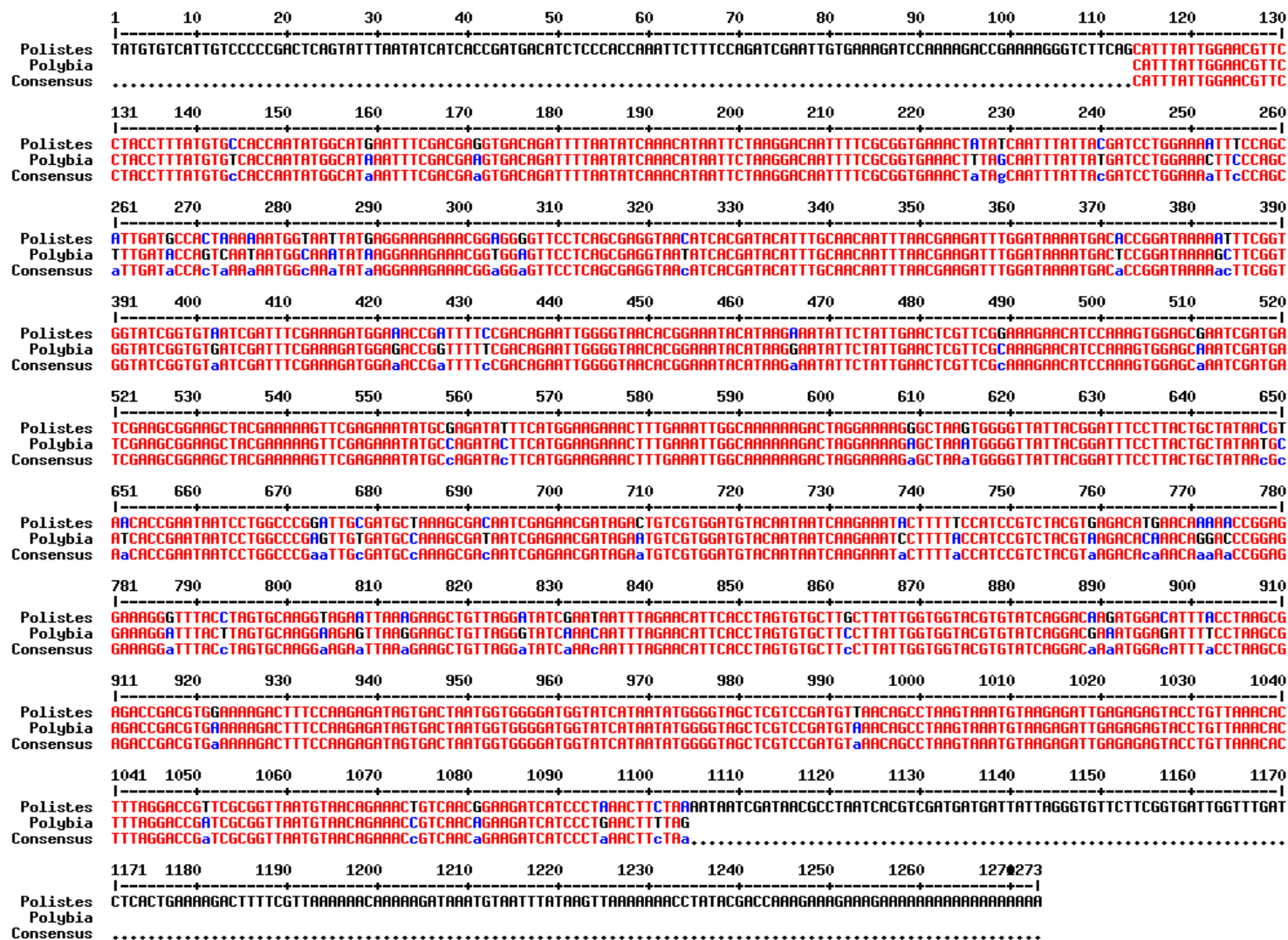


Figura 17. Alinhamento das seqüências de cDNA das hialuronidasas de *Polybia paulista* e *Polistes annularis*, mostrando a alta similaridade (regiões em vermelho) entre as duas espécies, realizado pelo Programa Multalign (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

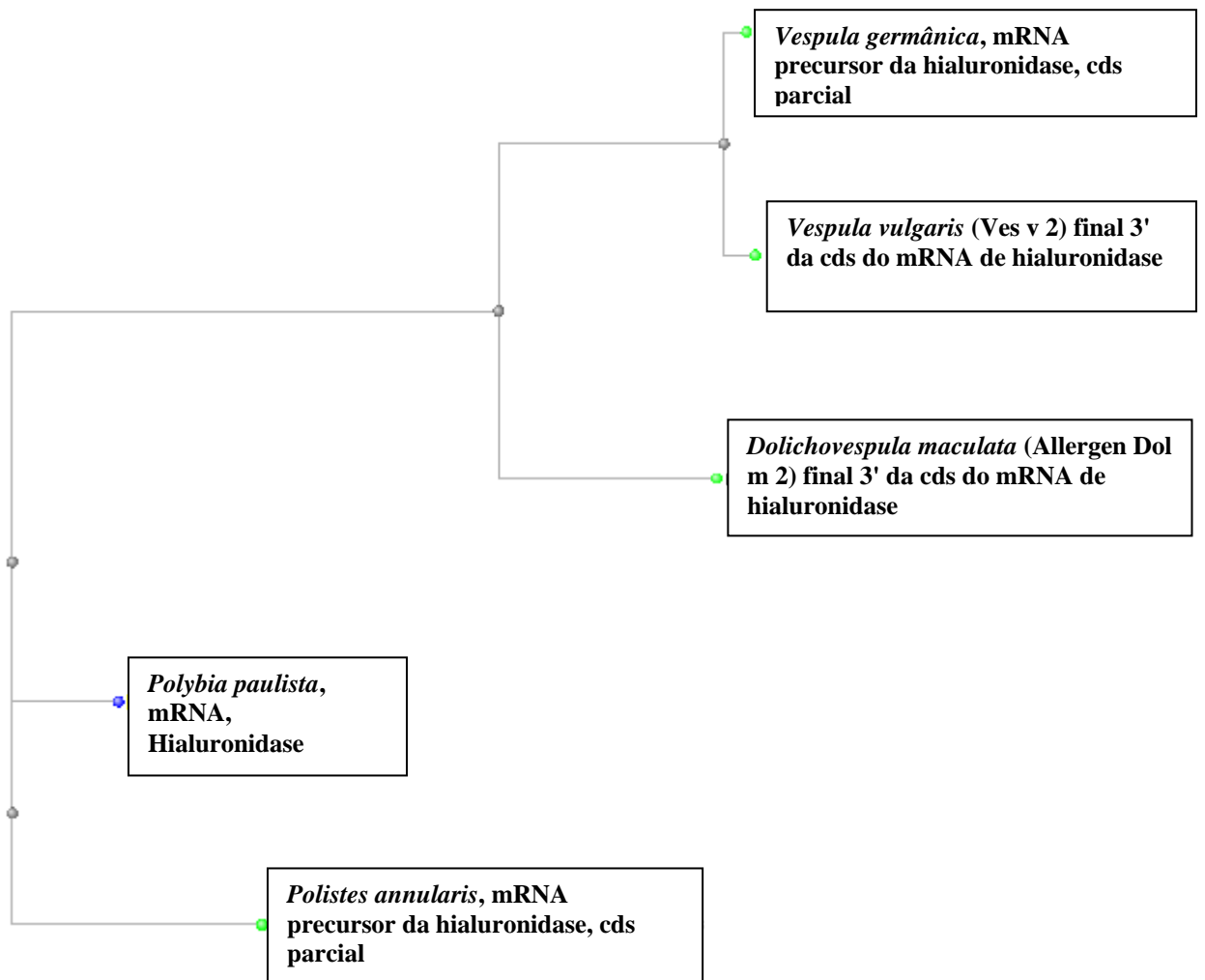


FIGURA 18. Cladograma baseado na identidade de seqüências de cDNA do alérgeno hialuronidase do veneno de vespas Hymenoptera, pelo Programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). Notar a maior identidade entre os alérgenos de *Polybia paulista* e *Polistes annularis*.

Através do Programa BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>), foi realizada a tradução “Six Frame” da seqüência obtida, sendo que a melhor fase de leitura foi encontrada no “frame” +2, onde conseguimos verificar identidade de seqüências com as demais hialuronidasas já depositadas no GenBank, conforme demonstrado abaixo. O fragmento protéico encontrado apresentou 329 aminoácidos e peso molecular de 38532,69 Daltons, sendo mais rico nos aminoácidos asparagina, glutamina e lisina. O resultado da tradução e o

alinhamento de aminoácidos com a hialuronidase de *Polistes annularis* podem ser observados nas **FIGURAS 19 e 20**, respectivamente.

>**Hialuronidase do veneno de *Polybia paulista*, frame+2 com 329 aminoácidos:**

NH₂-IYWNVPTFMCHQYGINFDEVTDENIKHNSKDNFRGETLAIYYDPGNFPALIPVNNNGKYKE
RNGGVQPQRGNITIIHLQQFNEDLDKMTDPKSFGGIGVIDFERWRPVFRQNWGNTEIHKEYSIELV
RKEHPKWSKSMIEAEATKKFEKYARYFMEETLKLAKKTRKRAKWGYGFPYCYNASPNNPGPSC
DAKAI IENDRMSWMYNNQEILLPSVYVRHKQDPEERIYLVQGRVKEAVRVSNNLEHSPSVLPYW
WYVYQDEMEIFLSETDVKKTFQEIVTNGGDGIIIWGSSSDVNSLSKCKRLREYLLNTLGP IAVN
VTETVNRSSLNF-**COOH**

FIGURA 19. Tradução da sequência de hialuronidase de *Polybia paulista*, realizada pelo programa BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) e encontrada no “frame” +2.

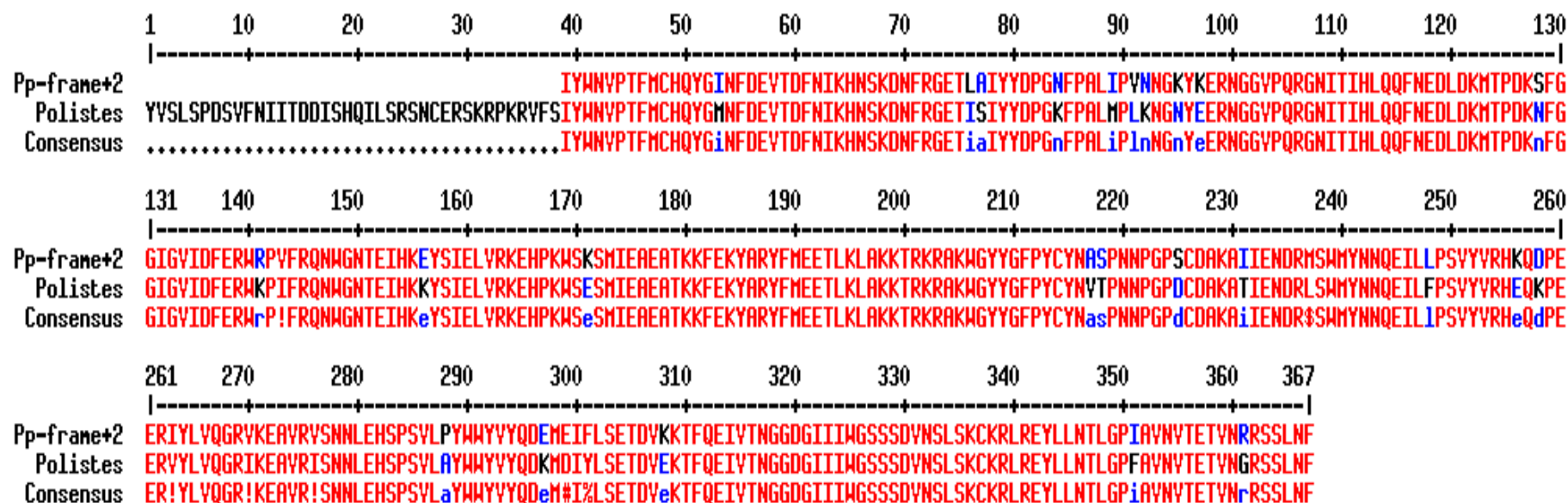


Figura 20. Alinhamento das seqüências de aminoácidos do alérgeno hialuronidase de *Polybia paulista* com o de *Polistes annularis*, mostrando que a tradução correta para seqüência de cDNA determinada, se encontra no frame +2, onde pode ser encontrada a maior similaridade entre as duas (regiões marcadas em vermelho).

A partir da obtenção da tradução correta para a sequência determinada neste trabalho, a análise da região aberta de leitura (ORF) realizada pelo programa Orf-Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) demonstrou sua posição na região entre as bases 26 até a base 990 (num total de 991 pb), abrangendo os códons universais de início (ATG) e de terminação (TAG). Este resultado, obtido pelo programa, pode ser observado na **FIGURA 21**. Nas **FIGURAS 22 (A, B)** estão as sequências completas de nucleotídeos e de aminoácidos mostrando que a sequência inicial encontrada (correspondente a de 25 pb ou 8 aminoácidos) não faz parte da região aberta de leitura, embora apresente identidade com *Polistes annularis*, onde esta sequência também ocorre. A análise dos domínios conservados foi realizado pelo Programa CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) e pode ser observada na **FIGURA 23**, com número de acesso pfam 01630. A sequência estudada mostra-se como sendo realmente integrante da família Glyco_hidro 56, que codifica para a enzima hialuronidase em diferentes tecidos e organismos.

Hialuronidase do veneno de *Polybia paulista*

Length: 321 aa

```

26 atgtgtcaccaatatggcataaatttcgacgaagtgacagat
M C H Q Y G I N F D E V T D F
71 aatatcaaacataattctaaggacaattttcgcggtgaaacttta
N I K H N S K D N F R G E T L
116 gcaatattatgatcctggaaacttcccagctttgataccagtc
A I Y Y D P G N F P A L I P V
161 aataatggcaaatataaggaaagaaacggtggagttcctcagcga
N N G K Y K E R N G G V P Q R
206 ggtaatatcacgatacatttgcaacaatttaacgaagatttgat
G N I T I H L Q Q F N E D L D
251 aaaatgactccggataaaagcttcggtggtatcgggtgatcgcg
K M T P D K S F G G I G V I D
296 ttcgaaagatggagaccggtttttcgcacagaattggggtaacacg
F E R W R P V F R Q N W G N T
341 gaaatacataaggaatattctattgaactcgttcgcaagaacat
E I H K E Y S I E L V R K E H
386 ccaaagtggagcaaatcgatgatcgaagcggagctacgaaaaag
P K W S K S M I E A E A T K K
431 ttcgagaaatatgccagatacttcattggaagaaactttgaaattg
F E K Y A R Y F M E E T L K L
476 gcaaaaaagactaggaaaagagctaaatggggttattacggattt
A K K T R K R A K W G Y Y G F
521 ccttactgctataatgcatcaccgaataatcctggcccagattgt
P Y C Y N A S P N N P G P S C
566 gatgccaaagcgataatcgagaacgatagaatgtcgtggatgtac
D A K A I I E N D R M S W M Y
611 aataatcaagaaatccttttaccatccgtctacgtaagacacaaa
N N Q E I L L P S V Y V R H K
656 caggaccgaggaaaggatttacttagtgcaaggaagagtttaag
Q D P E E R I Y L V Q G R V K
701 gaagctgttagggatcaacaatttagaacattcacctagtgtg
E A V R V S N N L E H S P S V
746 cttccttattgggtgtacgtgtatcaggacgaaatggagattttc
L P Y W W Y V Y Q D E M E I F
791 ctaagcgagaccgacgtgaaaaagactttccaagagatagtgact
L S E T D V K K T F Q E I V T
836 aatgggtggggatgggtatcataatatggggtagctcgtccgatgta
N G G D G I I I W G S S S D V
881 aacagcctaagtaaatgtaagagattgagagagtacctgttaaac
N S L S K C K R L R E Y L L N
926 actttaggaccgatcgcggttaatgtaacagaaaccgtcaacaga
T L G P I A V N V T E T V N R
971 agatcatccctgaacttttag 991
R S S L N F *

```

FIGURA 21. Resultado da análise da região aberta de leitura (ORF) realizada pelo programa Orf Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>), para o gene de hialuronidase do veneno de *Polybia paulista*.

(A)

CATTATTTGGAACGTTTCCTACCTTTATGTGTCACCAATATGGCATAAATTTTCGACGAAGTGACA
 GATTTTAATATCAAACATAATTCTAAGGACAATTTTCGCGGTGAAACTTTAGCAATTTATTATG
 ATCCTGGAACTTCCCAGCTTTGATACCAGTCAATAATGGCAAATATAAGGAAAGAAACGGTGG
 AGTTCCTCAGCGAGGTAATATCACGATACATTTGCAACAATTTAACGAAGATTTGGATAAAAATG
 ACTCCGGATAAAAAGCTTCGGTGGTATCGGTGTGATCGATTTTCGAAAGATGGAGACCGGTTTTTC
 GACAGAATTGGGGTAACACGGAAATACATAAGGAATATTCTATTGAACTCGTTCGCAAAGAACA
 TCCAAAGTGGAGCAAATCGATGATCGAAGCGGAAGCTACGAAAAAGTTCGAGAAATATGCCAGA
 TACTTCATGGAAGAAACTTTGAAATTGGCAAAAAAGACTAGGAAAAGAGCTAAATGGGGTTATT
 ACGGATTTCTTACTGCTATAATGCATCACCGAATAATCCTGGCCCGAGTTGTGATGCCAAAGC
 GATAATCGAGAACGATAGAATGTCTGTGGATGTACAATAATCAAGAAATCCTTTTACCATCCGTC
 TACGTAAGACACAAACAGGACCCGGAGGAAAGGATTTACTTAGTGCAAGGAAGAGTTAAGGAAG
 CTGTTAGGGTATCAAACAATTTAGAACATTCACCTAGTGTGCTTCCTTATTGGTGGTACGTGTA
 TCAGGACGAAATGGAGATTTTCCTAAGCGAGACCGACGTGAAAAAGACTTTCCAAGAGATAGTG
 ACTAATGGTGGGGATGGTATCATAATATGGGGTAGCTCGTCCGATGTAAACAGCCTAAGTAAAT
 GTAAGAGATTGAGAGAGTACCTGTTAAACACTTTAGGACCGATCGCGGTTAATGTAACAGAAAC
 CGTCAACAGAAGATCATCCCTGAACTTTTAG

(B)

IYWNVPTFMCHQYGINFDEVTDENIKHNSKDNFRGETLAIYYDPGNFPALIPVNNGKYKERNNGG
 VPQRGNITIHLOQFNEDLDKMTDPKSFSGGIGVIDFERWRPVFRQNWGNTEIHKEYSIELVRKEH
 PKWSKSMIEAEATKKFEKYARYFMEETLKLAKKTRKRAKWGYYGFPYCYNASPNNPGPSCDAKA
 IIEENDRMSWYNNQEILLPSVYVRHKQDPEERIYLVQGRVKEAVRVSNNLEHSPSVLPYWYVY
 QDEMEIFLSETDVKKTFQEIVTNGGDGIIIWGSSSDVNSLSKCKRLREYLLNLTLPYVNVVET
 VNRRSSLNF

FIGURA 22 (A, B). Esquemas demonstrativos das sequências de nucleotídeos (A) e de aminoácidos (B) da hialuronidase de veneno de *Polybia Paulista*, envolvidos na região aberta de leitura (ORF), determinada pelo Programa Orf Finder. As sequências não marcadas em (A) e (B), são correspondentes, mas não fazem parte da ORF.

gi 47606729	191	FEEAGRKFMEGTLHLGKFLRPNQLWGYLFPDCYN-NKFQDPK y --dGQCPAVEKKRNDNLKWLKASTGLYPSVYLK KD	267
gi 54037319	191	FEGAAKEFMEGTLKLGKHIRPKHLWGFYLPDCYN-NKFQVDN y --dGQCPDVEKKRNDLDLWLKESTGLYPSVYLK KD	267
gi 1708372	192	FEKAGKDFMEETLKLGRLLRPNHLWGYLFPDCYN-HHYDKPN ly -kGSCFDIEKKRNDLDSLWLKESTALFSPVYLTSR	269
gi 1346322	153	FEKYARLFMEETLKLAKKTRKQADWGYGYYPYCFN-MSPNNLV----PDCDATAMLENDKMSWLFNNQNVLLPSVYIRHE	227
gi 74966248	180	YEKACQKFFIETLRLGKRLRPNAKWGYLFPKCN G --DVGQKsd---TDCSTLRFQKFNDNLHHLWGESTALFPSIYLYPS	254
		250 260 270 280 290 300 310 320	
	*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....	
1FCU_A	232	LTSGERVG--LVGGRVK EALRIARQMTSR -KKVLPY WY KYQDRRD TDL SRADLEATLRKI TDL GADGFI I WGSSDDI	307
query	219	QDP PEERI y--LVQGRVK EAVRVSNNLEH SPs--VLPY WY VYQDEMEI FL SE TDV KKTFQEI VT NGGDGII I WGSSSDV	293
gi 25090550	258	LASSRHGRn--FVSRFVQ EALRVARTHAN HaLPVYV FTR -PTYSRRLTGLSEMDLIS TIGES AALGAAGVILWGDAGYT	334
gi 74739561	251	LPPAHQa--FVRHRLE EAFRVALVGHRR hP-LPVLAY V R-LTHRRS GR FLS Q DDLVSIGVSAALGAAGVVLWGDLSLS	325
gi 78190474	280	LMGTGKSqm--yVRHRVQ EALRVAIVSRDP H-VPVMPY VQ -IFYEMTDYLLPLEE LEH SLGESAAQGVAGAVLWLS SDK T	355
gi 74735617	252	LEGTGKSqm--yVQHRVA EAFRVA AAGDPN-LPVL P YVQ-IFYDTTNH FL PLDELEH SL GESAAQGAAGVVLWVSWENT	327
gi 585673	269	QSPVAATl--yVRNRV EAIRVSKIPDAK SpLPVFA YTRi VFTDQVLK FLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIM	345
gi 75039735	269	LKSSPFTal--yVRNRV EAIRVSKVKDI KHpLP IFVYAR pVFTDVL LTYL TEDDLVNTIGESVSLGVSGIVMWGSLNLT	346
gi 47606729	268	LKSNRQatl--yVR YRV E AIRVSKVGNAS DpVP IFVYIR lVFTDRTSEY LLE EDDLVNTIGEIV ALGTSGII IWDAMSLA	345
gi 54037319	268	LKSSRKAatl--yVR YRV LESIRVSKV DES NpVP IFVYIR lVFTD HVSEY LLEEDDLVNTIGEIV AQGTSGII IWDAMSLA	345
gi 1708372	270	ARSATALSklyVVRNRV HEAIRVSKIPDDK SpLPNFV YTR lVFTDQIF QFLS HDLVY TIGEIV ALGASGIVWGSQSLA	349
gi 1346322	228	LTPDQRVG--LVQGRVK EAVRISNNLKH S--PKVLS YWY VYQDDTNT FL TEDVKKTFQEI A INGGDGII I WGSSSDV	302
gi 74966248	255	QKQNP EYN f-vNSGALIT ETKR IKRNYCPS Ce IHVFT KIE YNPYYTPDDFYSKQNLAS TLDL AIKMNANSVVIW TS QSI	333
		330 340	
	*.....*.....*.....	
1FCU_A	308	NTKAKCLO FREYLN NELGPAVKRIALNNN	336
query	294	NSLSKCKRL REYLL N T LGPIAVNVTETVN	322
gi 25090550	335	TSTETCQY LKDY L TR LLVPYVVNVSWATQ	363
gi 74739561	326	SSEEECWHL HDY LVD T LG P YVINVT RAAM	354
gi 78190474	356	STKES CQAIKAYM D ST LGPFI V NVTS SAAL	384
gi 74735617	328	RTKES CQAIKEYM D T LGPFI L NVTS SGAL	356
gi 585673	346	RSMKSC LLLDNYM E T ILNPYI I INVT LAAK	374
gi 75039735	347	ENVQICTE LD TYIK NKLN PYI I INVT LAAK	375
gi 47606729	346	QRAAGCPI LHKYM Q T TLPYI V INVT LAAK	374
gi 54037319	346	QRSAGCPI LRQYM K T TLPYI V INVT LAAK	374
gi 1708372	350	RSMKSC LHLDNYM K T ILNPYI I INVT LAAK	378
gi 1346322	303	NSLSKCKRL REYLL T V LGPI T VNVTETVN	331
gi 74966248	334	GSR--CGSLQ TYVD N T LGPYLQ L TDRNLD	360

FIGURA 23. Motivos conservados encontrados para a sequência de hialuronidase de veneno de *Polybia paulista* (identificada por “query”). Os resíduos idênticos são marcados em vermelho, resíduos similares, em azul e, aqueles em cinza, correspondem aos de menor identidade. O alinhamento mostra os motivos conservados entre a hialuronidase de *Polybia paulista* e as hialuronidase de *Apis mellifera* ([1FCU_A](#)), precursor da hialuronidase tipo 1 de *Mus musculus* ([gi 78190474](#)), precursores das hialuronidases tipo 1, 2 e 3 e PH-20 de humanos ([gi 74735617](#); [gi 25090550](#) ; [gi 74739561](#); [gi 585673](#)) respectivamente; hialuronidase PH-20 de cachorro ([gi 75039735](#)); precursores das hialuronidases PH-20 em ratos ([gi 47606729](#); [gi 47606729](#)) respectivamente; precursor da hialuronidase PH-20 de coelho ([gi 1708372](#)); hialuronidase de *Dolichovespula maculata* ([gi 1346322](#)); proteína hipotética de *Caenorhabditis elegans* ([gi 74966248](#)).

Nas **FIGURAS 24, 25, 26 e 27** estão demonstrados os resultados da modelagem e o detalhamento da estrutura da hialuronidase de *Polybia paulista* construída conforme **Mat. e Met. Ítem 4.2.12** utilizando como modelo, a estrutura tridimensional da hialuronidase recombinante de *Vespula vulgaris* (rVesv2) (código PDB 2ATM), resolvida a 2.0 Å. Foram construídos 20 modelos e o de melhor energia é o que está representado nestas figuras. Os dados fornecidos pelo programa Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993) indicam que 92% dos resíduos estão em regiões estereoquímicamente favoráveis, 7,6% em regiões permitidas e apenas 0,3% em regiões não permitidas do diagrama de Ramachandran.

A superposição estrutural do modelo de hialuronidase de *Polybia paulista* com a estrutura resolvida de Ves v 2 (**FIGURA 24**) foi utilizada para inferir os possíveis sítios de glicosilação do alérgeno de *Polybia paulista*, os quais seriam os responsáveis por sua atividade imunogênica e foram determinados nos resíduos de Asn 70, Ser 90, Asn 179 e Asn 317 (**FIGURA 25**). Esta superposição também permitiu determinar que, da mesma forma que em Ves v 2, a estrutura da enzima de *Polybia paulista* se apresenta em um barril central (β/α)₇ e é estabilizada por duas pontes de dissulfeto observadas entre os resíduos de - Cys10-Cys300 e de Cys179-Cys 187 (**FIGURA 26**), importantes para manutenção da estrutura tridimensional da enzima, e sua ação sobre o substrato, o ácido hialurônico.

Para inferir a topologia da enzima e a posição e de seu sítio ativo (apresentados na **FIGURA 27**), bem como, os potenciais resíduos de aminoácidos, os quais, devem fazer interação como substrato (**FIGURA 28**), foi construído um outro modelo, a partir da estrutura da hialuronidase do veneno de abelha - Api m 2 - [Código PDB: FCQ]; em que a enzima está complexada com o tetrâmero de ácido hialurônico, e foi resolvida a 1.6 Å, por Markovic-Housley *et al.*, (2000). Através desta análise e, conforme se observa na **FIGURA 28**, os resíduos que fazem contatos polares com as hidroxilas e os átomos de nitrogênios do ácido hialurônico são: Glu 100, Asp 98, Tyr 42, Tyr 171, Tyr 214, Ser 289 e Ser 290. Além disto, pode ser também observado pelo modelo que todos estes resíduos estão a uma distância menor do que 3Å do substrato, a qual, é uma condição necessária para haver interação entre eles e um papel importante na catálise.

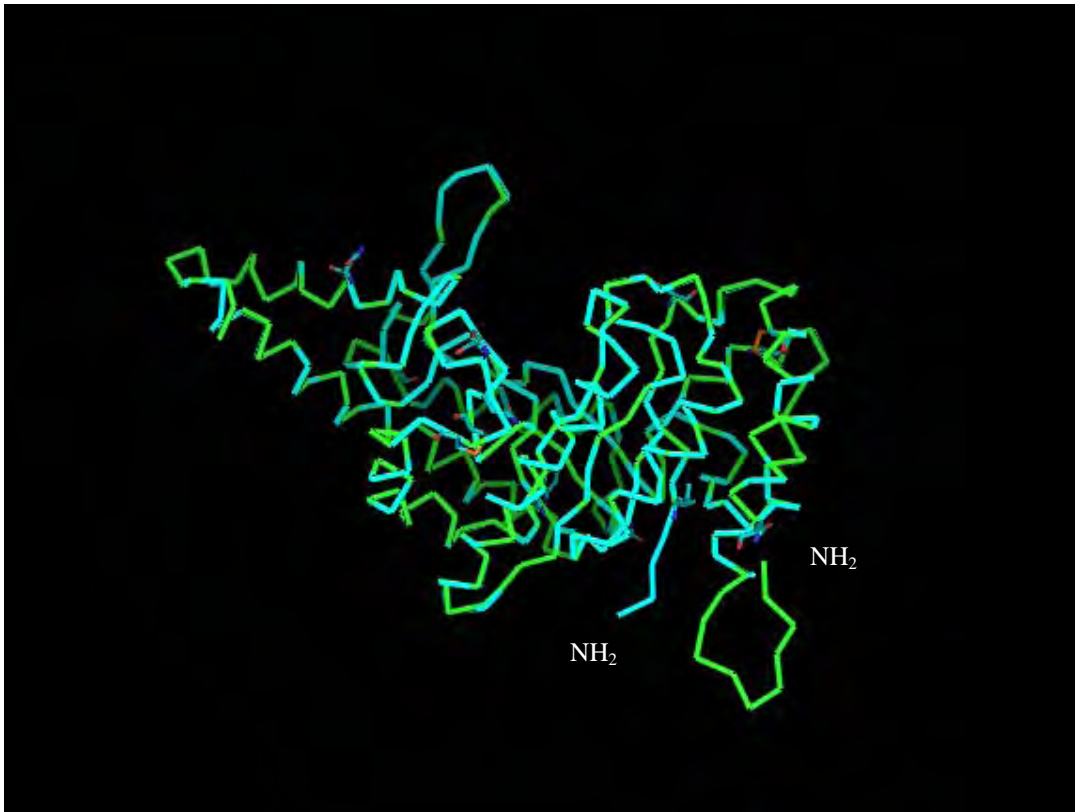


FIGURA 24. Modelo da estrutura tridimensional da hialuronidase de *Polybia paulista* (mostrada em verde), construído pelo Programa Modeller V 8.2 (SALI; BLUNDELL, 1993) e editado pelo Programa PyMol (DeLano, 1993), a partir da estrutura da hialuronidase de *Vespa vulgaris* (r Ves v 2 - mostrada em azul, **Referência PDB: r Ves v 2, 2ATM**). Notar a grande similaridade entre elas.

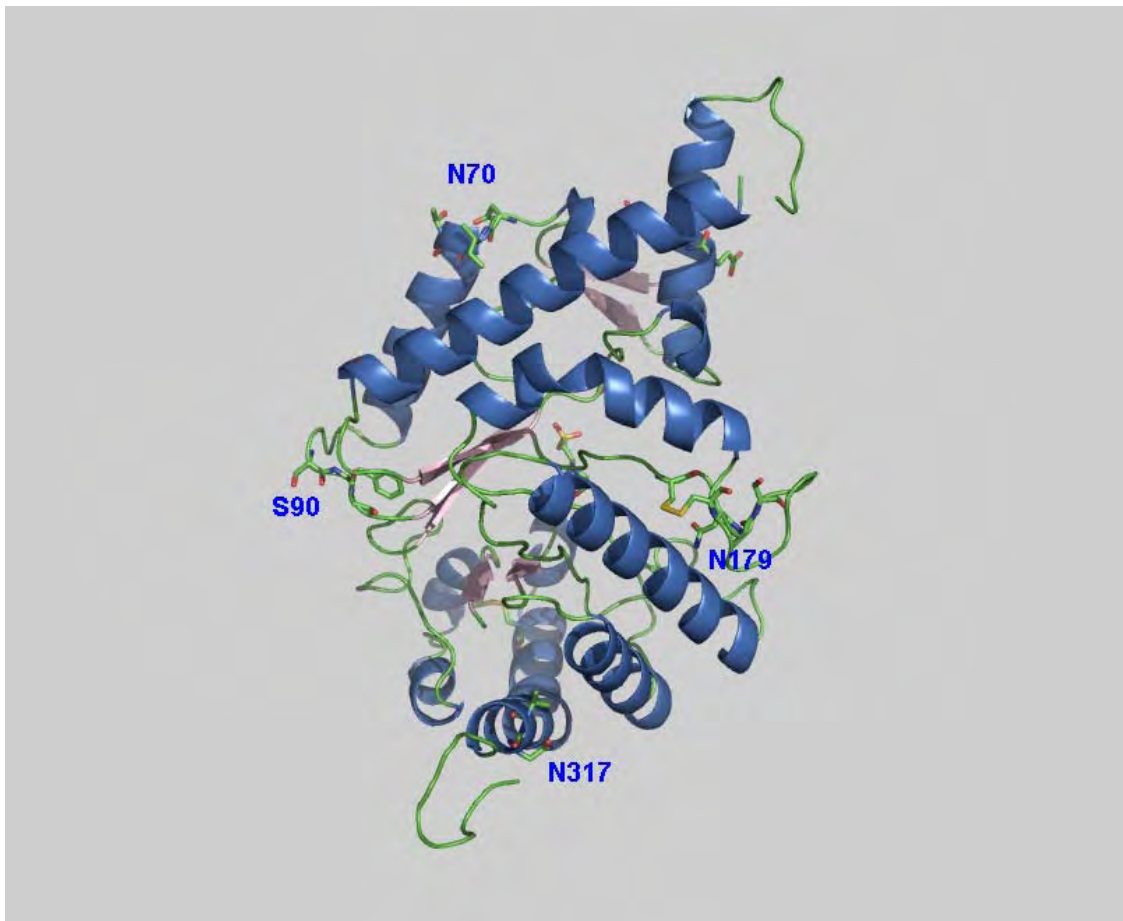


FIGURA 25. Prováveis sítios de glicosilação (marcados em azul: Asn 70, Ser 90, Asn 179, Asn 317) presentes na estrutura tridimensional da hialuronidase de *Polybia paulista*, determinados a partir da estrutura de hialuronidase de *Vespula Vulgaris* pelo Programa Modeller (SALI; BLUNDELL, 1993) V 8.2 e editados pelo Programa PyMol (DeLano, 1993).

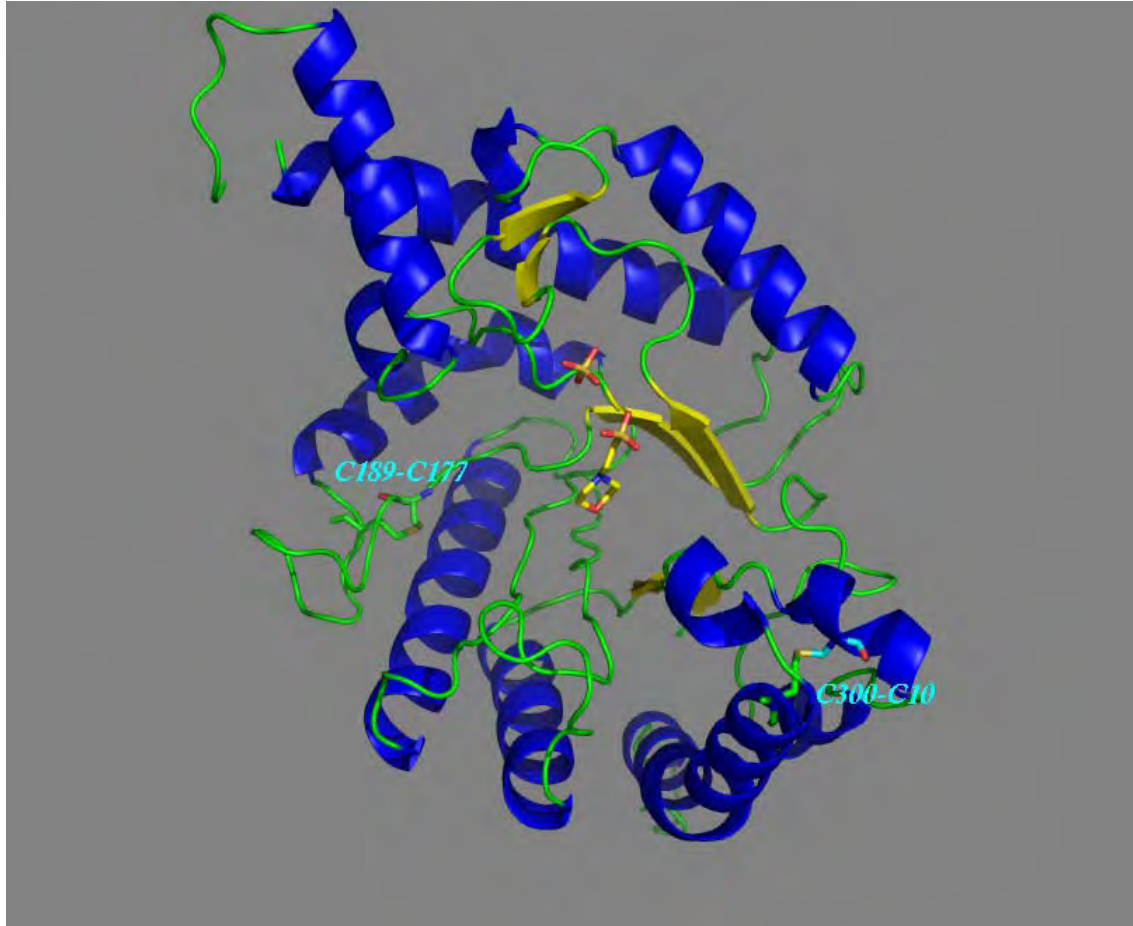


FIGURA 26. Modelo obtido com base na estrutura de hialuronidase de *Vespula Vulgaris* pelo Programa Modeller V 8.2 (SALI; BLUNDELL, 1993) e editado pelo Programa PyMOL (DeLano, 1993) mostrando a possível localização das pontes dissulfeto presentes na estrutura tridimensional da hialuronidase de *Polybia paulista* (Cys 10-Cys300 e Cys 177-Cys189), as quais são responsáveis pela manutenção da estrutura terciária da molécula.

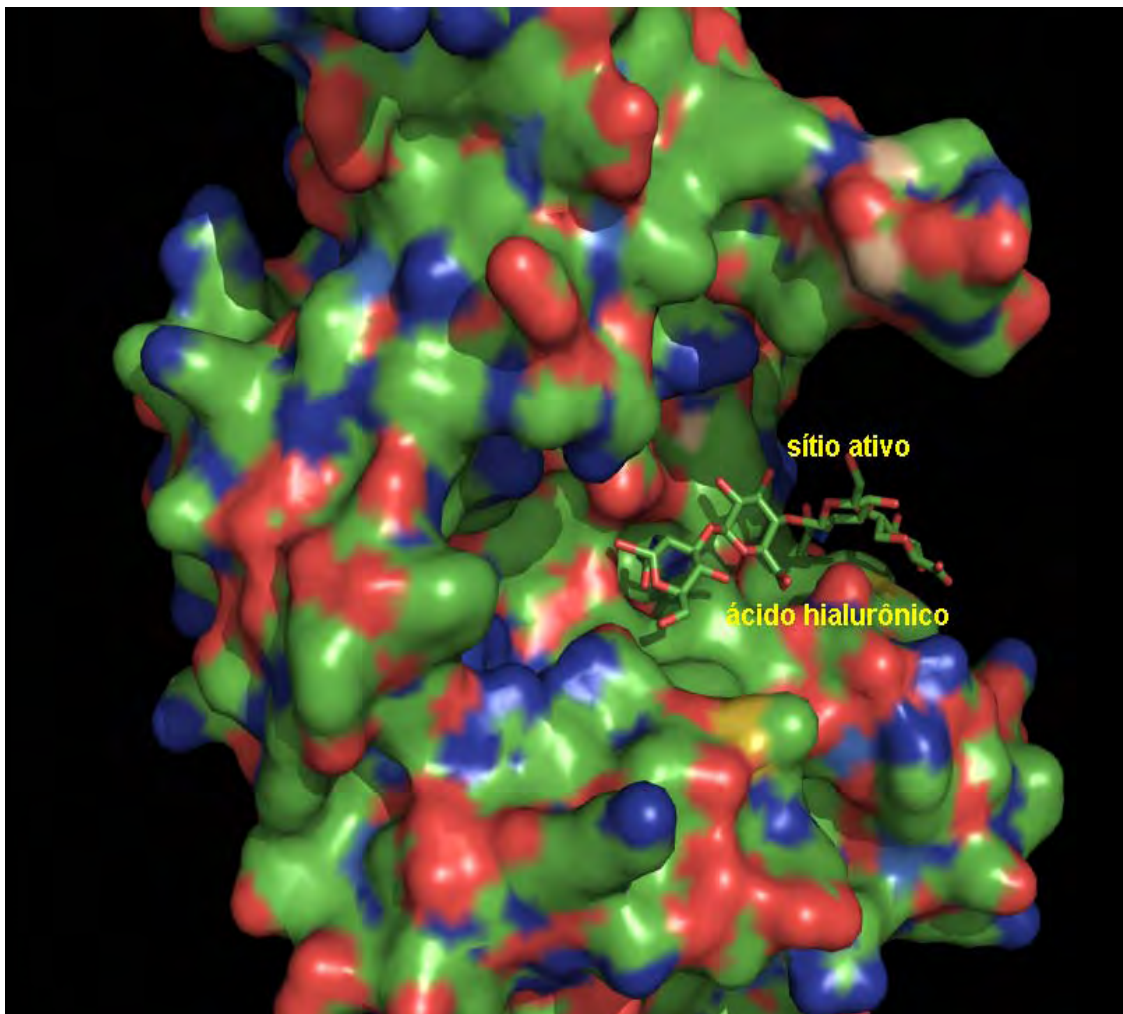


FIGURA 27. Modelo tridimensional mostrando a superfície da enzima hialuronidase de *Polybia paulista*, no qual se observa o sítio ativo em interação com o substrato ácido hialurônico. Este modelo foi construído, com base na estrutura da hialuronidase de abelha (Api m 2) complexada com o substrato, através do programa Modeller V 8.2 (Sali; Blundell, 1993) e posteriormente, editado pelo programa PyMol (DeLANO, 1993). As regiões em azul correspondem aos átomos de nitrogênio, as em vermelho aos átomos de oxigênio, enquanto que, as regiões em verde representam o esqueleto da molécula e os aminoácidos hidrofóbicos.

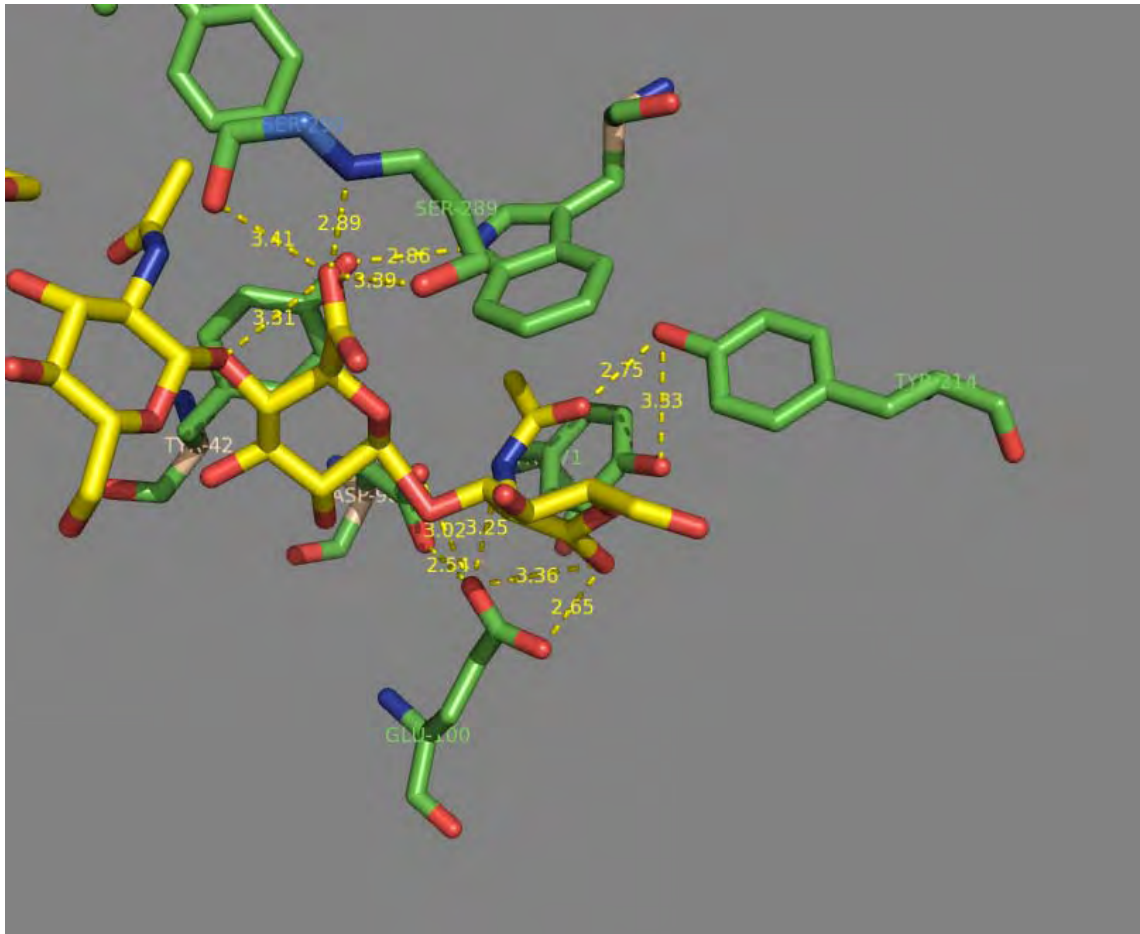


FIGURA 28. Modelo da enzima hialuronidase de *Polybia paulista*, no qual se observa os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da molécula, que interagem com o substrato - ácido hialurônico - mostrado em amarelo. Este modelo foi também construído, com base na estrutura da hialuronidase de abelha (Apl m 2) complexada com o substrato, através do programa Modeller V 8.2 (Sali; Blundell, 1993) e posteriormente, editado pelo programa PyMol (DeLano, 1993). Observar que os resíduos que fazem contatos polares com as hidroxilas e os átomos de nitrogênios do ácido hialurônico são: Glu 100, Asp 98, Tyr 42, Tyr 171, Tyr 214, Ser 289 e Ser 290, e que todos eles estão a uma distância menor do que 3 ângstrons do substrato.

DISCUSSÃO

6.0. DISCUSSÃO

Hialuronidases pertencem a um grupo de enzimas hidrolíticas, as quais degradam o ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molecular, encontrado em todos os tecidos de mamíferos e fluídos corpóreos. O ácido hialurônico é um componente da matriz extracelular de vertebrados, preenchendo os espaços entre células e fibras, e age como lubrificante, bem como uma barreira à penetração de partículas estranhas. Os níveis de ácido hialurônico são marcadamente aumentados durante a embriogênese, inflamação, transformação maligna e em qualquer lugar que seja requerida rápida substituição de tecido e remodelamento. Os defeitos no metabolismo do ácido hialurônico parecem relacionar-se a várias doenças sugerindo que o seu nível seja altamente controlado, no entanto, surpreendentemente o estudo de enzimas envolvidas na síntese e degradação do ácido hialurônico tem sido negligenciado. (MARKOVIK-HOUSLEY, Z., *et al*, 2000).

A resolução da estrutura da hialuronidase de abelha (MARKOVIK-HOUSLEY *et al.*, 2000), bem como, recentemente da estrutura natural e recombinante de *Vespula vulgaris* (SKOV *et al.*, 2006), forneceram importantes subsídios para o entendimento da ligação do substrato e do mecanismo catalítico assistido por ele. O conhecimento da estrutura dos epítomos (áreas da superfície do alérgeno que são reconhecidas por anticorpos específicos) da hialuronidase fornece a base para o entendimento de sua alergenicidade e espera-se que tenha um grande impacto no tratamento de alergia induzida pela hialuronidase. A determinação da seqüência de cDNA da enzima hialuronidase é um passo essencial para a determinação da estrutura tridimensional da

enzima e seus possíveis sítios de glicosilação e epítomos, os quais estão relacionados à sua imunogenicidade (MARKOVIK-HOUSLEY *et al.*, 2000).

As reações alérgicas provocadas por picadas de vespídeos são as maiores causas de anafilaxia mediada por IgE e pessoas sensíveis podem ser sensibilizadas por menos de 10 µg de proteína de veneno injetada na pele ou por uma única picada. A resposta imune, independente do tipo de anticorpo, parece ser controlada por um complexo mecanismo genético, pela rota e modo de imunização e pela natureza do imunógeno, embora ainda não seja clara o quanto esta natureza do alérgeno determina a extensão de respostas IgE em organismos sensíveis (LU *et al.*, 1995).

Venenos de abelhas contêm importantes alérgenos como hialuronidase, fosfolipase A2 e melitina, enquanto vespídeos apresentam três conhecidos alérgenos mais importantes: hialuronidase, fosfolipase A1 e antígeno 5. Portanto, sendo a hialuronidase uma enzima comum entre estes venenos é o único alérgeno em potencial, que pode promover reatividade-cruzada entre os venenos de abelhas e vespas. Além disso, freqüentes casos de reatividade-cruzada ocorrem entre diferentes gêneros e espécies de vespídeos, os quais apresentam alérgenos homólogos em seus venenos, que levam à produção de anticorpos de reconhecimento por IgE, devido à presença de epítomos comuns. Pacientes alérgicos a picadas de insetos, freqüentemente mostram múltipla sensibilidade a diferentes vespídeos, e até mesmo a abelhas. Isto ocorre, devido à reatividade cruzada ocasionada por um ou mais alérgenos. Entre os diferentes vespídeos ressaltamos os “hornets” (Vespões: gêneros *Vespa* e *Dolichovespula*), “yellow jackets” (Vespas de “jaqueta-amarela”: gênero *Vespula*), “wasps” (vespas do gênero *Polybia*, *Polistes*, etc), sendo o nível de reatividade cruzada muito maior entre alérgenos homólogos de “hornets” e “yellow jackets” do que entre estes e seus homólogos em *Vespas* e, entre todos estes vespídeos e abelhas. (KING *et al.*, 1996).

Baseando-se na análise de identidade da seqüência de hialuronidase com o mesmo alérgeno de outras espécies e gêneros diferentes, nossos resultados também são indicativos da ocorrência de altos padrões de reatividade cruzada entre o veneno de *Polybia paulista* com as espécies: *Polistes annularis* (93%), *Vespula vulgaris* (81%), *Vespula germânica* (81%) e *Dolichovespula maculata* (80%), o que viria a confirmar os dados obtidos por LU *et al.* (1994) e KING, *et al.* (1996), de que, em função da ocorrência de diferentes graus de similaridade para alérgenos homólogos em diferentes

espécies, se observa um maior nível de reatividade cruzada entre as vespas (dos gêneros *Polybia* e *Polistes*) do que entre as vespas com as “hornets” (dos gêneros *Vespa* e *Dolichovespula*) e com as “yellow jackets” (do gênero *Vespula*).

Estudos sobre reatividade cruzada realizados com alérgenos de vespídeos, mostram o seguinte o seguinte nível, em ordem decrescente de reação: hialuronidase > antígeno 5 > fosfolipase, sendo que, os epítomos contínuos (lineares) mostram maior índice de reatividade que os descontínuos (os quais são dominantes na maioria dos alérgenos), ressaltando assim, mais uma vez, a importância do conhecimento da configuração tridimensional da molécula (KING, *et al.*, 1996). Entretanto, quando comparamos níveis de reatividade cruzada entre estes diferentes alérgenos, podemos verificar através dos resultados obtidos por King *et al.* (1996), a ocorrência de maiores níveis de reatividade cruzada entre hialuronidase e A5 do que entre estes dois e a fosfolipase.

O padrão de reatividade-cruzada entre diferentes alérgenos é primariamente, relacionado a sua identidade de seqüências e em conseqüência, à produção de anticorpos que reagem com diferentes venenos, devido a regiões altamente conservadas. Por outro lado, alérgenos de venenos com identidade de seqüências menor que 70% usualmente, não apresentam altos níveis de reatividade-cruzada e, anticorpos espécie-específicos resultam de respostas às regiões variáveis da molécula. Venenos dos gêneros *Vespa* e *Vespula* são muito relacionados, enquanto que, o gênero *Polistes* é mais distanciado destes dois, mostrando um menor grau de reatividade cruzada e, portanto, uma menor identidade de seqüência de aminoácidos com estes dois gêneros de vespídeos, o que determina a exigência de um grande cuidado na escolha do veneno para a imunoterapia de pacientes sensíveis ao gênero *Polistes*. Mesmo entre os subgêneros europeus (*Polistes gallicus* e *Polistes dominulus*) e entre os norte-americanos (*Polistes annularis*, *Polistes exclamans*, *Polistes fuscatus*, *Polistes metricus*), se observa apenas reatividade-cruzada parcial (por exemplo, para o alérgeno antígeno A5 ocorre 98% de identidade entre *P. gallicus* e *P. dominulus* e quando estas espécies são comparadas com os gêneros americanos, a identidade observada para o mesmo alérgeno é de 85%) (LU *et al.*, 1994).

Este limitado grau de reatividade-cruzada de pacientes europeus, alérgicos a venenos de espécies americanas, foi explicado por Pantera *et al.* (2003) como sendo

devido à diferenças estruturais dos alérgenos das espécies de *Polistes* que levam à produção de anticorpos específicos, direcionados a regiões variáveis da molécula do alérgeno, existindo ainda, epítomos espécie-específicos no veneno dos gêneros *Polistes* ainda não estudados e caracterizados. De qualquer forma, esta reatividade cruzada parcial entre os subgêneros sugere que, os pacientes alérgicos sensibilizados por *Polistes* européias reagem a diferentes espectros dos epítomos do que, aqueles sensibilizados por *Polistes* norte-americanas, sugerindo importantes diferenças nos alérgenos.

Com o conhecimento que se têm sobre a reatividade cruzada, alguns médicos tentam tratar pacientes sensíveis a múltiplos vespídeos através de imunoterapias com um único veneno, enquanto outros, defendem que o tratamento com uma mistura de venenos, providencia melhores respostas clínicas e de anticorpos IgG. O tratamento com um único veneno pode induzir a produção de anticorpos específicos a ele, que por sua vez, podem não reagir completamente com outros venenos de vespídeos, deixando desta forma, de providenciar a proteção adequada que deve ocorrer no mecanismo protetor da imunoterapia. (KING *et al.*, 1996). Nos Estados Unidos, os diagnósticos e imunoterapias são realizadas com uma mistura padrão dos venenos de *Polistes* norte-americanas: *P. annularis*, *P. exclamans*, *P. fuscatus*, *P. metricus*, e os resultados sugerem que a adição desta mistura ao veneno das *Polistes* européias (*P. gallicus* e *P. dominullus*) pode levar a um maior potencial no diagnóstico (reduzindo as respostas falso-negativas) e, no tratamento de pacientes europeus alérgicos às espécies do gênero *Polistes* (confirmando mais uma vez, a suposta presença de epítomos espécie-específicos nos alérgenos de *Polistes* européias). Da mesma forma, uma mistura dos venenos de *Polistes* européias pode também ser utilizada na imunoterapia de pacientes no nordeste dos E.U.A. onde *P. dominullus* tem se estabelecido. (PANTERA *et al.*, 2003).

Estudos de epítomos de células B, contínuos e descontínuos, indicam que, tanto para hialuronidase quanto para a fosfolipase de veneno de insetos, ocorre um maior grau de reatividade-cruzada entre as “hornets” e “yellow jackets” do que entre estas e as abelhas. (KING *et al.*, 1996). Para o alérgeno hialuronidase ocorre 92% de identidade de seqüências entre “yellow jackets” e “hornets” e uma variação de 47-56% entre estas espécies e as abelhas. Estes dados despertam a possibilidade de ocorrência de reatividade-cruzada de epítomos de células B e T, apesar de ser incomum, o fato de,

seqüências com menos de 70% de identidade apresentarem níveis consideráveis de reatividade cruzada. Entretanto, isto ocorre, pois o grau de reatividade de proteínas homólogas depende do local de identidade de seqüência dos epítomos de interesse. (LU *et al.*, 1994; KING *et al.*, 1996). Ainda, segundo, King, *et al.* (1996), os homólogos de A5 e fosfolipase de “hornets” e “yellow jackets” apresentam a mesma identidade de seqüências (69 e 67% respectivamente), no entanto diferem marcadamente quanto à reatividade cruzada de seus epítomos descontínuos de células B, mas não de seus epítomos contínuos.

Dados obtidos por Pantera *et al.* (2003) com o alérgeno fosfolipase mostram identidade de seqüência de 62% entre *P. gallicus* (ou *P. dominullus*) e *P. annularis*, no trecho de aminoácidos de 1-43, o que indica um alto grau de divergência evolucionária e sugere fortemente a presença de epítomos espécie-específicos. Assim a múltipla sensibilidade exibida pela maioria dos pacientes a diferentes espécies de abelhas e vespídeos se devem à múltipla exposição a diferentes insetos ou à antigênica reatividade-cruzada.

Uma árvore genealógica gerada a partir do alinhamento de seqüências de A5, de vários vespídeos, obtida por Pantera *et al.* (2003) mostra que, as vespas do gênero *Polistes* são distantemente relacionadas às “yellow jackets” e que os subgêneros europeus e norte-americanos estão em diferentes ramos, apontando divergências no espectro de epítomos como citamos acima e, confirma as posições que estas espécies ocupam em cladogramas baseados em diferenças morfológicas. A árvore gerada a partir de nossos resultados, ou seja, a partir do alinhamento de seqüências de hialuronidase de vespídeos com maior identidade, mostra maior proximidade entre os alérgenos de *Polybia paulista* e *Polistes annularis*, confirmando a maior reatividade-cruzada existente entre as vespas do que entre estas e “yellow-jackets” (*V. vulgaris* e *V. germânica*) e “hornets” (*D. maculata*).

Enfim, todos estes resultados juntos indicam reatividade cruzada parcial dos epítomos de células B e T entre hialuronidases, fosfolipases e Ag 5 homólogos de vespídeos (“hornets”, “wasps” e “yellow jackets”). Além disso, estes alérgenos de veneno diferem na reatividade cruzada de seus epítomos contínuos e descontínuos de células B, em particular dos descontínuos. Desta forma, as diferentes extensões de reatividade cruzada tanto entre os vespídeos, como entre os vespídeos e as abelhas,

refletem a resposta imune variável do paciente associada à mistura de alérgenos, da qual os venenos são compostos. Adicionalmente, esta reatividade parcial pode ser também consequência da substituição de aminoácidos, os quais estão envolvidos na ligação do complexo de histocompatibilidade, do principal peptídeo antigênico, aos receptores das células T. A ligação de antígenos semelhantes, provenientes de venenos de diferentes espécies ou gêneros, aos receptores pode induzir respostas imunes provenientes das células T. Esta baixa regulação da resposta das células T pode ser um fator importante no mecanismo de imunoterapia, podendo ser útil e vantajoso no tratamento de pacientes alérgicos a venenos que apresentam reatividade-cruzada, pois, com a reatividade cruzada, pode ocorrer menor alergenicidade em relação àquela produzida pelo veneno, ao qual o paciente é sensível, podendo assim, ser utilizado em maior dose e com maior segurança. (KING *et al.*, 1996).

Além disso, estudos envolvendo alérgenos recombinantes de hialuronidase, fosfolipase e Ag 5 são relevantes pois levantam a possibilidade de uso de fragmentos peptídicos como reagentes imunoterápicos. Todas as três proteínas recombinantes carecem da conformação nativa das proteínas naturais, isto é, carecem da presença de pontes dissulfeto, (daí a diferença de atividade enzimática mesmo após o “refolding”) e de epítomos descontínuos de células B, embora conservem os contínuos, bem como os epítomos de células T das proteínas naturais (epítomos de células T consistem apenas em resíduos de aminoácidos seqüencialmente adjacentes, assim como os epítomos contínuos de células B). (LU *et al.*, 1994).

Quanto à análise em si, da seqüência de cDNA do alérgeno de hialuronidase de *P.paulista*, neste trabalho, não obtivemos nenhum segmento de DNA, representante da molécula precursora, e após a obtenção da tradução correta (na fase de leitura +2) da seqüência de 991pb obtida e, pela análise da janela aberta de leitura, determinamos que a região codificadora está compreendida entre as bases 26 a 990. Por outro lado, a seqüência inicial encontrada, antes da região aberta de leitura (correspondente a de 25 pb ou 8 aminoácidos) deve fazer parte da estrutura da molécula, uma vez que também está presente e é idêntica à seqüência de hialuronidase em *Polistes annularis*.

De acordo com os dados obtidos por LU *et al.* (1994), *D. maculata* apresenta uma seqüência inicial de 1-60 nucleotídeos que provavelmente representa a região precursora da hialuronidase, entretanto na porção 19-21 ocorre um inesperado codon de

parada, que pode representar um processamento incompleto do mRNA. A região codificadora termina na posição de 1053pb por um codon de parada e, a região entre 1057-1229pb representa a região 3' não traduzida com uma cauda de poli-A.

A hialuronidase de *P. paulista* obtida neste trabalho apresenta somente, em um pequeno trecho da molécula identidade de 71% com a proteína PH 20 de porquinho da índia, já quanto à proteína PH 20 humana ocorre apenas identidade de domínios protéicos, por realizarem a mesma função. A análise dos domínios mostrou que a sequência estudada mostra-se como sendo realmente integrante da família Glyco_hidro 56, que codifica para a enzima hialuronidase em diferentes tecidos e organismos e, os motivos conservados encontrados para a sequência de hialuronidase do veneno de *Polybia paulista* têm identidade com as seguintes enzimas e proteínas:

a) Api m 2, a hialuronidase do veneno de *Apis mellifera*, a qual apresenta 30% de identidade de sequência com hialuronidasas humanas envolvidas no processo de fertilização e degradação do ácido hialurônico.

b) precursor da hialuronidase tipo 1 de *Mus musculus*, uma proteína envolvida em processos de supressão de tumores.

c) precursores das hialuronidasas tipo 1, 2 e 3 em humanos, sendo a hialuronidase tipo 1 a responsável pela maior atividade hialuronidásica encontrada no plasma humano e também envolvida em processos de supressão de tumores.

d) hialuronidase PH-20 de humanos, uma proteína de membrana do espermatozóide, com papel essencial na adesão espermatozóide-óvulo.

e) hialuronidasas PH-20 de cachorro, coelho e porquinho-da-índia.

f) precursores das hialuronidasas PH-20 de rato, uma glicoproteína com grande identidade de sequências com a PH 20 de porquinho-da-índia, coelho, macaco e humanos, mas com pequena identidade com hialuronidasas do veneno de abelhas e vespas.

g) Dol m 2, a hialuronidase do veneno de *Dolichovespula maculata*, a qual apresenta 80% de identidade de sequência com a hialuronidase de *Polybia paulista*, determinada neste trabalho, 56% de identidade com a hialuronidase de *Apis mellifera* (Api m 2) e 27% de identidade com a PH 20 humana.

h) uma proteína hipotética de *Caenorhabditis elegans* (nemátoda).

São conhecidas seqüências de aminoácidos de mais de 70 alérgenos de venenos de insetos, com diferentes composições e funções biológicas, mas uma característica comum destes alérgenos de veneno é a variada extensão de identidade de seqüências com outras proteínas de nosso ambiente. Os alérgenos fosfolipaseA2, a hialuronidase e o peptídeo melitina de abelha apresentam pelo menos 20% de identidade de seqüências com proteínas de mamíferos: fosfolipases pancreáticas, proteína PH 20 (proteína de membrana do espermatozóide, envolvida no processo de fertilização) e uma proteína de ligação à calmodulina respectivamente, bem como, a fosfolipase A1 e a hialuronidase de *D. maculata* que respectivamente se assemelham enormemente às lípases e à proteína PH 20. Estas regiões de identidade de seqüências podem funcionar como epítomos de células B ou T comuns desde que, o tamanho mínimo destes epítomos esteja em torno de penta a deca-peptídeo. No entanto, como não é usual ocorrerem respostas imunes a estas proteínas, é possível que os pacientes alérgicos reconheçam suas próprias proteínas, mas respondam prontamente em casos de reatividade-cruzada entre venenos, mesmo quando expostos a apenas alguns microgramas do alérgeno. (LU *et al.*, 1994).

Quando os modelos das estruturas terciárias de Ag 5 de *Polistes gallicus* e *Polistes annularis* são comparados, aparecem diferenças nos “loops” superficiais das moléculas, indicando putativos epítomos espécie-específicos. No entanto, estas diferenças estruturais não são suficientes para explicar e sugerir o Ag 5 como a principal causa de diferentes respostas imunológicas entre venenos de *Polistes* européias e norte-americanas. Outras diferenças adicionais devem ocorrer, podendo também ser devidas as fosfolipases, pois estas são relativamente conservadas na região C-terminal (nos resíduos 130 a 300), mas completamente variáveis na porção N-terminal, sendo que, esta variabilidade pode levar à reatividade inseto-específica verificada em muitos pacientes. (PANTERA *et al.*, 2003).

Um modelo para a estrutura da hialuronidase de *Polybia paulista* foi construído a partir da estrutura da hialuronidase recombinante de *Vespula vulgaris* (rVes v 2), determinada por Skov *et al.* (2006), a qual, apresenta grande similaridade com o alérgeno correspondente de *Apis mellifera* (Api m 2) (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000). De acordo com o Programa Modeler 8.2, a enzima de *Polybia paulista* mostrou 92% de similaridade com a estrutura de rVes v 2, na qual foram descritos quatro potenciais sítios de glicosilação: Asn 79 (único sítio correspondente em Api m 2,

localizado no resíduo de Asn 115), Asn 99, Asn 127 e Asn 325, os quais, em *Polybia paulista* correspondem no modelo aos resíduos de Asn 70, Ser 90, Asn 179 e Asn 317, respectivamente. A glicosilação em Ser 70, diferentemente dos três outros sítios N-glicosilados, é do tipo O-glicosilado, representando uma ligação glicosídica do grupo hidroxila da serina. Comparando-se as seqüências primárias das hialuronidases de rVes v 2 e de *Polybia paulista*, a substituição de Asn por Ser ou vice-versa, deve ter ocorrido, muito provavelmente através da evolução, por uma mutação na segunda base dos dois codons, os quais são AAU para Asn e AGU para Ser. Embora os dois aminoácidos pertençam à mesma classe – polar, mas não carregados – o aminoácido serina apresenta um grau de hidrofobicidade muito maior do que a asparagina e, tendo-se em vista que, os resíduos de oligossacarídeos são muito hidrofílicos, isto indica uma menor tendência de glicosilação do resíduo de Ser 90, em relação aos três demais sítios de Asn. Assim, o possível sítio de glicosilação em Ser 90 na hialuronidase de *Polybia paulista* deverá ser investigado mais a fundo, a fim de se verificar primeiramente se estes potenciais sítios de glicosilação constituem-se realmente em determinantes antigênicos do alérgeno de *Polybia paulista* e, além disso, se a existência ou não de glicosilação neste sítio, pode implicar respectivamente, em um maior ou menor potencial imunogênico deste alérgeno quando comparado ao de rVes v 2. Este dado, se confirmado através de estudos de cristalização pode trazer novas e interessantes informações a respeito do potencial imunogênico da enzima em questão.

A análise dos epítomos de superfície e sítios de glicosilação da estrutura de rVes v 2, sugerem maior reatividade cruzada (92% de identidade de estrutura) entre rVes v 2 e Dol m 2 (o alérgeno de *D. maculata*) que entre rVes v 2 e Api m 2 (o alérgeno de *Apis mellífera*). Isto ocorre por que em termos de topologia de superfície a rVes v 2 e Api m 2 (55% de identidade de estrutura) são muito diferentes desde que, a variação na seqüência primária entre as duas está confinada na superfície de molécula (envolvida no reconhecimento pelos anticorpos) e distante do sítio ativo, o que explica o baixo nível de reatividade imunológica cruzada entre os venenos de *V. vulgaris* e *Apis mellífera*. No caso da sobreposição das estruturas de Ves v 2 e *Polybia paulista* (92% de identidade de estrutura), tanto em termos de seqüência de aminoácidos quanto em termos de topologia de superfície, se observa um alto grau de similaridade entre as duas,

levando à suposição de que os níveis de imunoreatividade cruzada entre elas sejam equivalentes àqueles propostos para Ves v 2 e Dol m 2.

A estrutura de rVes v 2 apresenta um barril central (β/α)₇, o qual é estabilizado por duas pontes dissulfeto (Cys19/Cys308 e Cys 185/Cys197), tal como foi observado para a estrutura de hialuronidase de *Polybia paulista*, também estabilizada por duas pontes dissulfeto, localizadas nos resíduos Cys 10/Cys300 e Cys 177/Cys189, os quais são extremamente importantes para a manutenção. Na estrutura cristalográfica da hialuronidase do veneno de abelha, determinada por Markovic-Housley *et al.* (2000) também foram observadas duas pontes dissulfeto, com características diferentes dos vespídeos acima, sendo que a primeira Cys 189/Cys 201 estabiliza a base de um longo “loop” na extremidade C-terminal de β_4 e, a segunda Cys 22/Cys 313 junta dois elementos distantes de estrutura secundária entre o N- e o C-terminal da molécula.

Com base no alinhamento de seqüências e na comparação com o alérgeno Api m 2 co-cristalizada com o substrato ácido hialurônico, foi proposto para rVes v 2 que uma cavidade conservada, próxima ao centro ativo está envolvida na ligação do mesmo. A mesma análise comparativa e de sobreposição, foi feita entre a estrutura de hialuronidase, construída para *Polybia paulista* e a de Api m 2 co-cristalizada com o substrato ácido hialurônico. Os resultados desta análise demonstraram a presença de sete resíduos de aminoácidos que fazem contatos polares com as hidroxilas e os átomos de nitrogênios do ácido hialurônico: Asp 98, Glu 100, Tyr 42, Tyr 171, Tyr 214, Ser 289 e Ser 290. Na maioria das glicosidases, dois resíduos acídicos exercem um papel essencial na catálise do substrato, sendo que um deles age como doador de prótons e o outro como nucleófilo (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000). Na hialuronidase de abelha Api m 2, os únicos dois resíduos, extremamente conservados e presentes no sítio de ligação do substrato são a Asp 111 e o Glu 113 o qual, parece agir como doador de prótons. Na estrutura de hialuronidase de *Polybia paulista* caracterizada neste trabalho, estes dois importantes resíduos correspondem a Asp 98 e ao Glu 100.

Todos estes dados são interessantes, pois sugerem que o alérgeno hialuronidase de *Polybia paulista* tem grande potencial para apresentar reatividade cruzada com o mesmo alérgeno de *Apis*. Além disso, embora sendo muito mais comum e abundante no estado de São Paulo, os dados também indicam que, um indivíduo alérgico ao veneno, que tenha sido ferroadado por *Polybia paulista* poderá desenvolver reação imunológica

cruzada com espécies típicas de países de clima temperado, como é o caso da *Vespula vulgaris* e *Dolichovespula maculata*. Entretanto, para que isto seja confirmado, há necessidade de análises similares com os outros demais alérgenos dos venenos.

CONCLUSÕES

7.0. CONCLUSÕES

- Através da metodologia de RACE-PCR, neste trabalho foi determinada e caracterizada, pela primeira vez, a seqüência completa de cDNA do alérgeno - **hialuronidase** - do veneno da vespa urbana *Polybia paulista*, a qual, é bastante agressiva e abundante no Estado de São Paulo, sendo responsável por muitos acidentes de importância médica.

- A seqüência de nucleotídeos de 991 pb, apresentou maior grau de identidade - 93% - com a mesma enzima de veneno da vespa *Polistes annularis*; 81% com as hialuronidases de *Vespula vulgaris* e de *Vespula germânica* e 80% com a de *Dolichovespula maculata*. Com base nestes resultados nossos resultados mostram potenciais padrões de altos níveis de reatividade cruzada entre o veneno de *Polybia paulista* com o veneno das espécies *Polistes annularis*, seguido por *Vespula vulgaris*, *Vespula germânica* e *Dolichovespula maculata*.

- A tradução da seqüência de cDNA, obtida na fase de leitura +2, revelou que a hialuronidase de *Polybia paulista* é constituída por 329 aminoácidos, sendo mais rica em asparagina, glutamina e lisina e, diferentemente do que foi relatado por Oliveira (1994) apresenta peso molecular de 38532,69 Daltons.

- A partir da tradução correta, a análise feita pelo Programa Orf Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) demonstrou que a região aberta de leitura

(ORF) da hialuronidase de *Polybia paulista* se encontra na região entre a base 26 até a base 990 (num total de 991 pb).

- A análise dos domínios conservados pelo Programa CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) mostra que a sequência estudada é integrante da família Glyco_hidro 56, que codifica para a enzima hialuronidase em diferentes tecidos e organismos. A enzima também apresenta domínios protéicos conservados com outras proteínas de nosso ambiente tais como, a proteína PH 20 em mamíferos e hialuronidase do plasma humano, envolvida em processos de supressão de tumores.

- Os resultados da modelagem e detalhamento da estrutura da hialuronidase de *Polybia paulista*, quando comparada à estrutura de rVes v 2, resolvida a 2.0 Å (**Código PDB: r Ves v 2, 2ATM**) utilizada como modelo, mostraram que a enzima revela-se como uma proteína dimérica, tal como relatado anteriormente por Oliveira (1994). Da mesma forma que em Ves v 2, a estrutura da enzima de *Polybia paulista* se apresenta em um barril central (β/α)₇ e é estabilizada por duas pontes dissulfeto Cys 10/Cys300 e Cys 177/Cys189, e apresenta quatro potenciais sítios de glicosilação - Asn 70, Ser 90, Asn 179 e Asn 317, responsáveis por sua atividade imunogênica.

- Da sobreposição das estruturas de rVes v 2 e *Polybia paulista* (92% de identidade de estrutura), se observa tanto em termos de sequência de aminoácidos quanto em termos de topologia de superfície, um alto grau de similaridade entre as duas, levando à suposição de que os níveis de imunoreatividade cruzada entre elas sejam tão elevados quanto àqueles propostos para Ves v 2 e Dol m 2.

- De um outro modelo, construído a partir da estrutura da hialuronidase do veneno de abelha - Api m 2- [**código PDB: FCQ**; em que a enzima está complexada com o tetrâmero de ácido hialurônico, e foi resolvida a 1.6 Å, por Markovic-Housley *et al.*, (2000)], pudemos inferir a posição do sítio ativo da hialuronidase de *Polybia paulista* e os resíduos que fazem contatos polares com as hidroxilas e os átomos de nitrogênios do ácido hialurônico: Glu 100, Asp 98, Tyr 42, Tyr 171, Tyr 214, Ser 289 e

Ser 290, sendo que, todos estes resíduos estão a uma distância menor do que 3,0 Å do substrato, a qual, é uma condição necessária para haver interação entre eles e um papel importante na catálise.

- Pela similaridade de seqüências e de estrutura, os dados deste trabalho sugerem que o alérgeno hialuronidase de *Polybia paulista* tem grande potencial para apresentar reatividade cruzada com o mesmo alérgeno de *Apis*, bem como, com espécies típicas de países de clima temperado, como é o caso da *Vespula vulgaris* e *Dolichovespula maculata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNARD, J. H. Studies of 400 Hymenoptera sting deaths in the United States. **Journal of allergy and clinical immunology**, Saint Louis, v.52, p. 257-264, 1973.

BECERRIL, B.; *et al.* Cloning and characterization of cDNAs that code for Na(+)-channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. **Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autonoma de Mexico**, Cuernavaca, v.128, n. 2, p.165-171, 1993.

BERNSTEIN, D.I.; *et al.* Clinical an immunologic studies of rapid venom immunotherapy in Hymenoptera-sensitive patients. **Journal of allergy and clinical immunology**, Saint Louis, v. 84, n. 6, p. 951-959, 1989.

BLUM, M. S.; *et al.* Chemical, insecticidal and antibiotic properties of fire ants venom. **Science**, Washington, v.128, n. 3319, p. 306-307, 1985.

BONFANTI-ALMEIDA, J. C. **Estudo da viabilidade do veneno de abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Linneaus, 1758) (Hymenoptera-Apidae) como biocida em ovos de *Diatrea sacharalis* (Fabricius, 1974)**. 1994. 77 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

BOUSQUET, J.; HUCHARD, G.; MICHEL, F.B. Toxic reactions induced by Hymenoptera venom. **Annals of allergy, asthma & immunology**, Arlington, v. 52, p. 371-374, 1984.

BREITENEDER, H.; *et al.* Allergens in Hymenoptera Venom. **International archives of allergy and immunology**, Basel, v. 118, p. 309-10, 1999.

CHAUD-NETO, J.; GOBBI, N.; MALASPINA, O. Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas. Em: **Venenos Animais: uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994, p. 173-201.

DeBACH, P. The necessity for an ecological approach to pest control on citrus in California. **Journal of economic entomology**, Lanham, v.44, p. 443-447, 1951.

DeLANO, W. L. The PyMOL User's Manual (2002). **DeLano Scientific**, Palo Alto, 1993.

DOTIMAS, E. M.; HIDER, R. C. Honeybee venom. **Bee world**, Bucks, v. 68, n. 2, p. 51-71, 1987.

EIANARSSON, R.; MOBERG, U. Isotachopphoretic characterization of stinging insect venom. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v. 13, p. 585-588, 1981.

FANG, K.S.Y.; *et al.*. The cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, p. 895-899, 1988.

FITCH, C. D.; *et al.* Comparison of North American and European Polistes Venom Allergens. **Journal of allergy and clinical immunology**, Saint Louis, v. 117, p. S 309, 2006.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. A Low Molecular Weight Isoform of Hyaluronidase: Purification from Indian Cobra (*Naja naja*) Venom and Partial Characterization. **The Journal of biochemistry**, Tokio, v.70, n. 6, p.708-712, 2005.

GIRISH KS, SHASHIDHARAMURTHY R, NAGARAJU S, GOWDA TV, KEMPARAJU K Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**, Paris, v. 86, n. 3, p.193-202, 2004.

GMACHL M, KREIL G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 8, p. 3569-3573, 1993.

GMACHL, M.; KREIL, G. The precursors of the bee venom constituents Apamin and MCD Peptide are encoded by two genes in tandem which share the same 3'-Exon. **The Journal of biological chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 21, p. 12704-12708, 1995.

GODDARD, J. **Physician' s guide to arthropods of medical importance**. 4 .th ed. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2003. v. 4.

GOLDEN, D.B.; MARSH, D.G.; FREIDHOFF, L.R.; et al. Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. **Journal of allergy and clinical immunology**, Saint Louis, v.100, p. 760-766, 1997.

GRIGOREAS, C. H.; et al. Insect venom allergy in Greek adults. **Allergy**, Copenhagen, v. 52, p.51-57, 1997.

HEINIG, J.H.; et al. Allergy to venom from bee or wasp: the relation between clinical and immunological reactions to insects stings. **Clinical Allergy**, Oxford, v.18, p. 71-78, 1988.

HERBERT, F. A. & SALKIE, M. I. Sensitivity to Hymenoptera in adult males. **Annals of allergy, asthma & immunology**, Arlington, v. 48, p.12-12, 1982.

HO, C. L.; et al. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 259, n. 3, p. 259-264, 1994.

HOFFMAN, D. R.; WOOD, C.L.; HUDSON, P. Demonstration of IgE and IgG antibodies against venoms in the blood of victims of fatal sting anaphylaxis. **Journal of allergy clinical Immunology**, Saint Louis, v. 71, p.193-196, 1983.

HOFFMAN, DR.; JACOBSON, R.S Allergens In Hymenoptera venom venom. XXVII: bumblebee venom allergy and allergens. **Journal of allergy clinical Immunology**, Saint Louis, v. 97, p. 812-821, 1996.

KALYONCU, A. F.; et al. Bee and wasp venom allergy in Turkey. **Annals of allergy, asthma & immunology**, Arlington., v. 78, p.408-412, 1997.

KEMENY D. M.; et al. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 139, n. 2, p. 217-23, 1984.

KING, T. P. Immunochemical studies of stinging insect venom allergens. **Toxicon**, Elmsford, v. 34, n. 11/12, p. 1455-1458, 1996.

KING, T. P.; JIM. S. Y.; WITTOWSHI, K. M. **Internacional Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v 77, p. 1-8, 2003.

KING T. P, SPANGFORT M. D. Structure and biology of stinging insect venom allergens. **Internacional Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 123, n. 2, p. 99-106, 2000.

KING T. P.; et al. Yellow jacket venoms allergens hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 98, n. 3, p. 588-600, 1996.

- KOLARICH, D.; *et al.* The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 272, n. 20, p. 5182-5190, 2005.
- KUDO, K.; TU, A.T. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 386, n. 2, p. 154-62, 2001.
- LASKOWSKI, R. A.; *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, [n.L.], v. 26, p. 283-291, 1993.
- LICHTENSTEIN, L.M.; *et al.* A case for venom treatment in anaphylactic, sensitivity to Hymenoptera sting. **New England journal of medicine**, Waltham, v. 290, p. 1223-1227, 1974.
- LOMOMTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 31, p. 37-40, 1983.
- LU, G.; VILLALBA, M.; COSCIA, M. R.; HOFFMAN, D.R.; KING, T.P. Sequense Analisis and Antigenic Cross-reactivity of a Venom Allergen, Antigen 5, from Hornets, Wasps and Yellow Jackets. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.150, p. 2823-2830, 1993.
- MACKESSY, S. P. Characterization of the major metalloprotease isolated from the venom of the Northern Pacific Rattlesnake, *Crotalus viridis oreganos*. **Toxicon**, Elmsford, v. 34, n. 11/12, p.1277-1285, 1996.
- MANZOLLI-PALMA, M.F.; PALMA, M.S. Aspectos entomológicos das alergias provocadas por ferroadas de Hymenoptera sociais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v.15, n. 92, p. 123-125, 1992.
- MARKOVIC-HOUSLEY Z.; *et al.* Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. **Structure**, [n.L.], v.8, n. 10, p. 1025-1035, 2000.
- MARRAKCHI, N.; *et al.* Ceratostatin, a serine protease from *Cerastes cerastes* venom, with platelet-aggregating and agglutinating properties. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 247, n. 1, p. 121-128, 1997.
- MOREY, S. S.; KIRAN, K.M.; GADAG, J.R. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 2, p. 188-195, 2006.
- NAKAJIMA, T. Pharmacological Biochemistry of Vespid Venoms. In: Piek, T. **Venoms of the Hymenoptera Biochemical, pharmacological and behavioral aspects**. London: Academy Press, 1986. Cap 6, p 309-324.

NG, H.C.; *et al.* Cloning and molecular characterization of the first aquatis hyaluronidase SFHYA1 from the venom of stonefish (*Synanceja horrida*). **Gene**, Amsterdam, v. 346, p.71-81, 2005.

NITTNER-MARSZALSKA, M.; *et al.* Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. **Med Sci Monit**, [n.L.], v. 10, n. 7, p. 324-329, 2004.

NOVEMBRE, A.; *et al.* Epidemiology of insect venom sensitivity and its correlation to clinical and atopic features. **Clinical and experimental allergy**, Oxford, v. 28, p. 834-838, 1998.

OLIVEIRA, M. R. P. **Fracionamento e caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Polybia paulista***. 1994. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

OLIVEIRA, M. R. P. **Efeitos do veneno bruto de *Polybia (Mirapetra) paulista* (Lehring, 1896) em camundongos: estudo bioquímico, farmacológico e morfológico**. 2000. 135 p. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PANTERA B.; *et al.* Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1623, p. 72-81, 2003.

PASTORELLO, E. A.; *et al.* Anaphylaxis from insect stings: Na underestimated problem? **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, [n.L.], v. 10, n. 2, p. 91-93, 1997.

PIEK, T. Insect venoms and toxins. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, Oxford: Pergamon press, v. 11, p. 595-633, 1985.

PIRPIGNANI, M.L.; *et al.* Strutral immunological aspects of *Polybia scutellaris* Antigen 5. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 407, n. 2, p. 224-230, 2002.

POLDERMANS, B. Proteolytic enzyme. In: GERHARTZ, W. (Ed). **Proteolytic enzyme in industry: production and application**. Germany: VHC Publishers, 1990. p.108-123.

RAMANAIAH, M.; PARTHASARATHY, P. R.; VENKAIAH, B. Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. **Biochimistry international**, Marrickville, v. 20, n. 2, p. 301-31, 1990.

REISMAN, R.E. Stinging insect allergy: progress and problems. **Journal of allergy clinical Immunology**, Saint Louis., v. 75, p. 553-555, 1985.

RICHARDS, O.W. **The social wasps of the Americas excluding the Vespinae.** London: British Mus. (Nat. Hist.).1978. 580 p.

RICHARDS, O.W.; DAVIES, R.G. Classification y biologia. **Tratado de entomologia Imms**, Barcelona, v. 2, p. 988, 1984.

RICHARDS, O.W.; RICHARD, M.J. Observation on the social wasps of South América (Hymenoptera – Vespidae) **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, London, v. 102, p. 170-178, 1951.

RUBERTI, M. **Estudo comparativo da composição protéica e enzimática do veneno de Hymenoptera sociais.** 2000. 97 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SALI, A.; BLUNDELL T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints **Journal of Molecular Biology, London**, v. 5/234, n. 3, p.779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHMIDT, J.O. Biochemistry of insect venoms. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 27, p. 339-368, 1982.

SCHMIDT, J.O.; BLUM, M. S.; WILLIAM, L.O. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, Elmsford , v. 24, n. 9, p.907-921, 1986.

SCHMIDT, M.; McCONNEL, T. J.; HOFFMAN, D.R. Immunologic characterization of the recombinant fire ant venom allergen Sol i 3. **Allergy**, Copenhagen, v. 58, p. 342-349, 2003.

SHEKENDEROV, S. Anaphylactogenic properties of bee venoms and its frations. **Toxicon**, Elmsford, v. 12, p. 529-534, 1974.

SHILKIN, K.B.; CHEN, B.T.M.; KHOO, O.T. Rhabdomyolysis caused by hornet venom. **British Medical Journal**, London, v. 1, n. 793, p.156-157, 1972.

SIIGUR, E.; AASPÖLLU, A.; SIIGUR, J. Sequence diversity of Vipera lebetina snake venom gland serine proteinase homologs-result of alternative-splicing or genome alteration. **International Journal on Genes and Genomes**, Amsterdam, v. 263, p.199-203, 2001.

SKOV, L. K.; *et al.* Structure of recombinant Vesv 2 at 2.0 resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. **Acta crystallographica**, Copenhagen, v. D62, p. 595-604, 2006.

SOLDATOVA L.N.; *et al.* Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with

Escherichia coli. **Journal of allergy clinical Immunology**, Saint Louis, v. 101, n. 5, p. 691-698, 1998.

TANIZAKI, M. M.; *et al.* Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of bothrops jararaca (jararaca). **Toxicon**, Elmsford, v. 29, p. 673-681, 1991.

WINNINGHAM, K. M.; *et al.* **Journal of allergy clinical Immunology**, Saint Louis, v. 114, p. 928-933, 2004.

VALENTINE, M.D. Insect venom allergy: diagnosis and treatment. **Journal of allergy clinical Immunology**, Saint Louis, v. 73, p. 299-304, 1984.

VALLES, S.M.; PERERA, O.P.; STRONG, C.A. Purification, biochemical characterization, and cDNA cloning of a glutathione S-transferase from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, p. 981-988, 2003.

Rio Claro, 23 de novembro de 2007.

Giselly Pereira da Silva
Orientada

Prof. Dra. Márcia Regina Brochetto-Braga
Orientadora