



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



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

CLONAGEM, ANÁLISE ESTRUTURAL E IMUNOLÓGICA
DO ALÉRGENO ANTÍGENO 5 DO VENENO DA VESPA *Polybia paulista*
(HYMENOPTERA: VESPIDAE)

Danielli Thieza Giratto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março - 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



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

CLONAGEM, ANÁLISE ESTRUTURAL E IMUNOLÓGICA
DO ALÉRGENO ANTÍGENO 5 DO VENENO DA VESPA *Polybia paulista*
(HYMENOPTERA: VESPIDAE)

Danielli Thieza Giratto

ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto Braga

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março - 2011

Dedicatória

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.

Dedico este trabalho a todos meus amigos e familiares que acreditaram em mim e que me apoiaram nos momentos difíceis com palavras de conforto, carinho e força para seguir em frente.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que me iluminou durante toda a minha trajetória, meu amigo fiel, me protegendo e iluminando.

À Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto Braga, pela oportunidade, orientação, incentivo, ajuda, amizade, paciência, conhecimento científico, confiança e pela preocupação com minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela colaboração, parceria no trabalho e permissão do uso do laboratório nos experimentos imunológicos.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, pela colaboração oferecida nos experimentos da parte molecular.

Ao Prof. Dr. Antônio Joaquim da Silva Neto pela construção do modelo estrutural e pelas importantes análises e discussões.

Ao técnico do laboratório Anderson Rodrigues, pela ajuda e colaboração.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Martins pela disposição e importante auxílio no sequenciamento.

Ao laboratório de Genética de peixes coordenado pelos Profs. Drs. Patrícia Pasquali Parise Maltempi e Prof. Dr. Anderson Luis Alves pela disponibilização de uso dos equipamentos.

Expresso meus sinceros agradecimentos às Instituições e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com meu aprendizado e amadurecimento, em especial:

Aos meus amigos de laboratório Débora e Franco pela companhia durante todo esse tempo, pela amizade agradável, pelos ensinamentos trocados, pelas ajudas, disposição e principalmente por trabalharmos em equipe o que é fundamental no sucesso de uma pesquisa e por todos os momentos inesquecíveis que passamos.

A todos os meus amigos do Programa da Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial a Duda, Daiana, Leticia, Karim, Bia, Dea, Alex, Edmara, Ives, André, Luís e Gerson.

À Capes pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Isabel e Francisco, por permanecerem sempre ao meu lado, por todo amor, carinho, atenção, apoio, incentivo e conforto que me proporcionaram durante essa jornada.

Ao meu querido noivo Paulo, pelo incentivo, paciência, compreensão nos momentos mais difíceis e pelo simples fato de fazer parte da minha vida.

A todos que, de uma forma ou de outra, dentro ou fora da Universidade, contribuíram para o meu crescimento não só profissional, mas também pessoal.

Epígrafe

Pobre de quem teve medo de correr os riscos. Porque este talvez não se decepcione nunca, nem tenha desilusões, nem sofra como aqueles que têm um sonho a seguir. Mas quando olhar para trás - porque sempre olhamos para trás - vai escutar seu coração dizendo: "O que fizeste com os milagres que Deus semeou por teus dias? O que fizeste com os talentos que teu Mestre te confiou? Enterraste fundo em uma cova, porque tinhas medo de perdê-los. Então, esta é a tua herança: a certeza de que desperdiçaste sua vida".

A vida é muita para ser insignificante.

Charles Chaplin

Resumo

RESUMO

Polybia paulista ou popularmente “paulistinha” é uma vespa social da família Vespidae. Possui hábitos urbanos e grande ocorrência no Sudeste do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, onde tem causado muitos acidentes de importância médica. Na composição de seu veneno encontra-se um potente alérgeno, a proteína Antígeno 5 (Ag5) e embora sua função biológica ainda seja desconhecida, este alérgeno é responsável por importantes reações imunológicas cruzadas com o Ag5 do veneno de outros insetos sociais e com outras proteínas de eucariotos. A importância da reatividade cruzada em pacientes alérgicos ao veneno de vespas sociais é inquestionável, pois estas interações têm impacto direto sobre o diagnóstico e a seleção da melhor conduta terapêutica. Os diagnósticos de alergia são baseados na detecção de anticorpos do tipo IgE específico ao veneno por testes cutâneos ou de sangue. No entanto, respostas falso-positivas decorrentes da reatividade cruzada e respostas falso-negativas provenientes da baixa quantidade de IgE detectada, dificultam a interpretação dos resultados. A sequência completa de cDNA (621 pb) do alérgeno Ag5 do veneno da vespa *P. paulista*, foi clonada e a análise dos nucleotídeos revelou uma similaridade de 99% com a vespa *Polybia scutellaris*. Anticorpos policlonais foram produzidos contra a fração eletroforética protéica do Ag5 (25 kDA) de *P. paulista* e analisados imunologicamente por *Western blotting*. Os resultados demonstraram que os anticorpos reconheceram especificamente o alérgeno Ag5 no veneno bruto de *P. paulista* bem como, desenvolveram maior reação imunológica cruzada com os alérgenos Ag5 do veneno das vespas do gênero *Polybia*, embora não se descarte a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com venenos de outros insetos sociais não testados neste estudo. O modelo construído para o Ag5 de *P. paulista* revelou a ausência de sítio ativo e uma estrutura molecular flexível e hidrofílica, indicando ser uma proteína potencialmente mais imunogênica do que Ag5 de *Vespula vulgaris* utilizada como molde. Os dados aqui encontrados podem contribuir com a eficácia da imunoterapia em pacientes alérgicos disponibilizando maiores informações sobre a imunoreatividade cruzada.

Palavras-chave: Antígeno 5. Veneno. cDNA. *Western Blotting*. *Polybia paulista*.

Abstract

ABSTRACT

Polybia paulista, commonly known as "paulistinha", is a social wasp of the family Vespidae. This species occurs in urban areas and is frequent in the Southeastern Brazil, especially in the State of São Paulo, where it has been responsible for many accidents of medical significance. A potent allergen, the protein antigen 5 (Ag5), is an important compound of the wasp venom. Although its biological function remains unknown, this component is responsible for substantial cross-immunological reactions with the Ag5 of venoms of other social insects and with eukaryotic proteins. The importance of cross-reactivity in allergic patients to the wasp venoms is unquestionable, because these interactions present a direct impact on the diagnosis and on the selection of the therapeutic treatment. Allergic diagnoses are based on the detection of IgE specific to the venom via cutaneous or blood tests. However, sometimes they are hampered by false-positive responses as a result of cross-reactivity and false-negative responses that can occur due to the low amount of IgE detected as consequence of the low sensitivity of the test. The full-length cDNA (621 bp) from the venom allergen Ag5 wasp *P. paulista* was cloned and nucleotide analysis revealed 99% of similarity with the wasp *Polybia scutellaris*. Polyclonal antibodies were produced against the electrophoretic protein fraction of Ag5 (25 kDa) of *P. paulista* and immunologically analyzed by *Western blotting*. The results showed that the antibodies strongly recognized the allergen Ag5 in the venom of *P. paulista* and developed higher cross-immune reaction with the same allergen in wasp venoms of the genus *Polybia*, although the possibility of cross reaction with other insect venoms not tested in this study cannot be excluded. The model carried out for the Ag5 *P. paulista* revealed the absence of an active site and molecular structure flexible and hydrophilic protein, indicating a potentially more immunogenic allergen than the Ag5 of *Vespula vulgaris* used as template. The data found here contribute to the effectiveness of immunotherapy in allergic patients by providing more information on the cross-immunoreactivity.

Keywords: antigen 5. Venom. cDNA. Western Blotting. *Polybia paulista*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Operária de *Polybia paulista* e (B) ninho de *P. paulista* 26
- Figura 2.** Perfil eletroforético de réplicas de amostras de RNA total, extraído de abdomens das vespas *P. paulista*, em gel de agarose a 2%, em TAE 1X (Sambrook et al., 1989). Nas canaletas **2 a 9**, foram aplicadas amostras de RNA referentes à extração dos materiais depois de no mínimo, 7 dias em TRIzol a - 85°C. **M** corresponde ao DNA *ladder* de 1kb (de 100 a 12.000 pb). Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green:amostra). As setas indicam as bandas de RNAs de 28s, 18s e 5s, utilizadas como parâmetro do grau da integridade das amostras. e 5s, utilizadas como parâmetro do grau da integridade das amostras. 48
- Figura 3.** Perfil eletroforético de cDNA de *P. paulista* em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X. Nas canaletas de **1 a 6** estão as amostras de cDNA sintetizadas com a enzima RT- Improm (Promega). **M** corresponde ao padrão de DNA “ladder” de 1 Kb. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green:amostra). 49
- Figura 4.** Banda de cDNA de 600 pb correspondente à sequência completa de Ag5 a qual foi amplificada à temperatura de anelamento de 48,3°C e concentração de 0,4 µM de cada um dos iniciadores Ag5 F/Ag5 R. **M** refere-se ao DNA ladder de 1kb (de 100 a 12.000 pb). A análise foi realizada em gel de agarose 1%, TAE 1X e a amostra visualizada com Blue Green (1:5 v/v; corante: amostra). 50
- Figura 5.** Resultado das análises (gel de agarose a 1% em TAE 1X) de algumas das colônias brancas recombinantes por PCR, utilizando-se o par de iniciadores Ag5 F/Ag5R, de acordo com as condições de reação previamente determinadas. **M** corresponde ao *ladder* de 100 pb (100 a 1000 pb). Observar que as canaletas 1, 2, 3, 6 e 7 contêm realmente a banda do tamanho esperado, correspondente ao Ag5. 51
- Figura 6.** Resultado das análises de restrição, com EcoR I, de oito amostras dos clones recombinantes (em gel de agarose a 1% em TAE 1X). Nas canaletas de **1 a 5** observam-se algumas amostras contendo o plasmídeo pCR®8/GW/TOPO® (2817 pb) não digerido em suas 3 configurações 51

(relaxada, enrolada e super-enrolado, respectivamente de cima para baixo no gel) e, nas canaletas **6 a 13** amostras digeridas com a enzima, em que pode-se constatar o inserto de 600 pb. **M** corresponde ao *ladder* de 1 kb (Invitrogen 100-12000 pb). Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green: amostra).

- Figura 7.** Análise de similaridade da sequência completa de cDNA do Ag5 de *P. paulista* com as sequências de outras espécies de vespas similares depositadas no Banco de Dados (GenBank). Observar maior similaridade (99%) com o mesmo alérgeno da vespa *P. scutellaris*. 52
- Figura 8.** Alinhamento da sequência completa de cDNA do Ag5 do veneno de *P. paulista* com as sequências do mesmo alérgeno do veneno das vespas *P. scutellaris*, *P. exclamans*, *P. annularis*, *P. dominulus* e *V. vulgaris*. Programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-oulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). 53
- Figura 9.** Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Ag5 do veneno da vespa *P. paulista* obtidas deste trabalho com a mesma proteína obtida por estudos proteômicos (SANTOS, 2007) e, com as sequências de Ag5 de *P. scutellaris*, *P. annularis* e *P. exclamans*, *P. dominulis* e *V. vulgaris*. Programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-oulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). 54
- Figura 10.** Árvore Filogenética das sequências de aminoácidos do alérgeno Ag5 do veneno de *P. paulista* com o Ag5 de outras vespas similares pela análise de *Neighbor Joining*. Os números mostrados nos ramos equivalem aos valores de *bootstrap* (1000 réplicas), encontrados pelo programa DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution) (XIA, XIE, 2001). 55
- Figura 11.** Determinação da região aberta de leitura (ORF) compreendida entre as bases 226 a 620 (total 132 pb) da sequência de cDNA de Ag5 de *P. paulista*, realizada pelo Programa *Orf Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) o qual resultou em uma proteína de 132 aminoácidos quando traduzida no frame +1. 56
- Figura 12.** Alinhamento, feito pelo Programa NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), mostrando, respectivamente (de cima para baixo), os domínios conservados das 57

seguintes proteínas: 1SMB_A = cadeia A da estrutura cristalina de uma Proteína humana associada ao complexo de Golgi, relacionada à PR-1 de patogênese em plantas; *query* = sequência Ag5 de *P. paulista* ; gi 118361401 = proteína extracelular SCP-like de *Tetrahymena thermophila*; gi 66269580 = proteína “venom allergen-like 1 de *Schistosoma mansoni*; gi 71005370 = proteína hipotética UM01204.1 do fungo *Ustilago maydis* 521; gi 126658530 = possível lipoproteína de cianobactéria *Cyanothece* sp. CCY0110; gi 115379323= proteína hipotética STIAU_7127 *Stigmatella aurantiaca*; gi 39588579 = proteína hipotética CBG01188 do fungo *Caenorhabditis briggsae*. ; gi 17540532 = proteína extracelular “SCP-like” (scl-10) do nematóide *Caenorhabditis elegans*. No esquema, a cor vermelha representa os resíduos de maior similaridade dos domínios, o azul, menor similaridade e o cinza representa ausência de similaridade entre os resíduos.

Figura 13. Perfil eletroforético do extrato bruto do veneno de *P. paulista* com cerca de 10 mg de proteínas totais, em gel preparativo de gradiente (10-18%) de poli(acrilamida), sob condições denaturantes, do extrato bruto do veneno de *P. paulista* com cerca de 10 mg de proteínas totais. As bandas foram coradas com Coomassie Blue G-250 e em seguida a faixa de massa molecular 25 KDa foi recortada do gel. À esquerda tem-se um padrão protéico pré-corado de ampla variação em massas molecular e (12, 17, 24, 31, 38, 52, 76, e 225 kDa) que foi utilizado como referência para o cálculo da massa de cada banda no extrato de veneno.

58

Figura 14. Resultado de *Western Blotting* utilizando os anticorpos policlonais produzido em camundongos contra a fração eletroforética do veneno bruto de *P. paulista* (correspondente ao alérgeno Ag5), demonstrando a especificidade dos anticorpos e o nível de imunoreatividade cruzada com os extratos brutos de veneno de, 1- *P. sericea*, 2- *P. ignobilis*, 3- *A. pallipes pallipes*, 4- *P. lanio lanio*, 5- *A. mellifera* e 6- *S. invicta*. No gel de sistema desnaturante de poli(acrilamida) (10%) foram aplicadas 80µg de proteína de cada um destes extratos. Em **(A)** membrana após revelação com o sistema de fosfatase alcalina, **(B)** perfil proteico do gel após transferência.

60

Figura 15. Gráfico comparativo da análise densitométrica da membrana de nitrocelulose após imunodeteção (Fig. 19) mostrando os diferentes níveis

61

de intensidade das bandas marcadas. Conforme o esperado observa-se maior intensidade da reação específica do anticorpo anti-Ag5 de *P. paulista* contra o mesmo alérgeno do veneno desta vespa.

- Figura 16.** Modelo tridimensional mostrando a topologia da proteína Ag5 de *P. paulista*, no qual se observa a ausência de um sítio ativo formado. Este modelo foi construído com base na estrutura do Ag5 da *Vespula vulgaris*, através do programa Modeller V8.2 (SALI, BLUNDELL, 1993) e editado pelo programa PyMol (DELANO, 1993). As regiões em verde correspondem ao grupo de aminoácidos hidrofóbicos, em azul aminoácidos que contêm nitrogênio (histidina, arginina, asparagina e triptofano), em vermelho: aminoácidos que contêm o grupo oxigênio (treonina, aspartato), em amarelo os grupos enxofre (sulfidríla), como cisteína e metionina. 63
- Figura 17.** Modelo tridimensional do alérgeno Ag 5 da vespa social *P. paulista*, mostrando os elementos de estrutura secundária. A molécula é do tipo “sanduiche” beta contendo três fitas betas antiparalelas ligadas a sete alfa hélices e por *loops* extensos. 64
- Figura 18.** Comparação entre o modelo estrutural **(A)** Ag5 de *P. paulista* e **(B)** a estrutura tridimensional obtida por cristalografia de Ves v 5 mostrando as quatro pontes dissulfeto existentes nessa última, e ausência das mesmas em *P. paulista*. 65
- Figura 19.** Modelos tridimensionais para o alérgeno Ag5 da vespa social *P. paulista*, mostrando as regiões imunogênicas previstas pelo programa Modeller (SALI, BLUNDELL, 1993) e PyMol (DELANO, 1993). Em (A) os epítomos conformacionais estão mostrados em lilás, em (B) mostra-se a topologia dos mesmos epítomos (azul, amarelo e vermelho, representam respectivamente os átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio presentes nos grupos laterais dos resíduos de aminoácidos). 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência de iniciadores específicos.	
		38
Tabela 2.	Iniciadores do vetor pCR®8/GW/TOPO®.	
		38
Tabela 3.	Condições da obtenção do cDNA completo do alérgeno Ag5.	
		39
Tabela 4.	Regiões previstas como epítomos conformacionais na proteína Ag 5 de <i>P. paulista</i> em acordo com a análise realizada no servidor <i>Conformational Epitope Prediction Server</i> (KULKARNI-KALE, BHOSLE, KOLASKA, 2005). Os aminoácidos que estão em letra minúscula, apresentam acessibilidade pelo anticorpo menor que 25%.	
		66

LISTA DE ABREVIações

Å	Angstron
Ag5	Antígeno 5
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta básica de pesquisa sobre alinhamento)
cDNA	DNA complementar
CRISP	Proteínas ricas em cisteínas
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DEPC	Dietil-pirocarbonato
GliPr	Glicoproteínas relacionadas a tumores cerebrais e patogenias
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgE	Imunoglobulina do tipo E
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
mA	Miliampère
mM	Milimolar
MQ	Milli-Q (água ultrapura)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanômetro
ORF	<i>Open reading frame</i> (Região aberta de leitura no DNA)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDB	Banco de dados de proteínas
PLA	Fosfolipase
PM	Massa molecular

PRP	Proteínas relacionadas com patogenicidade
RAST	Radioalergosorbent test (teste de IgE específico)
Rf	Coeficiente de migração no gel
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase
SCP-like	Proteínas extracelulares
SDS	Detergente dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris/acetato/EDTA
TBS-T	Tampão Fosfato de sódio/Tween
u.a.	Unidades arbitrárias
U	Unidade
V	Volts
v/v	Diluição volume por volume
µg	Microgramas
xg	Aceleração centrífuga
µL	Microlitros

TRADUÇÕES

Gaps – espaços vazios numa sequência de proteína ou DNA.

Loops – *alças nas estruturas protéicas*

Western blotting - transferência e imobilização de proteínas numa membrana, utilizada para estudo de reações específicas antígeno-anticorpo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES.....	11
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
2 OBJETIVOS	23
3 REVISO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Ordem Hymenoptera, subordem Apocrita	25
3.2 Aspectos da vespa social <i>P. paulista</i>	26
3.2 Acidentes com Hymenoptera sociais.....	27
3.3 Composição do veneno de Hymenoptera: propriedades bioquímicas, reações alérgicas e tóxicas	28
3.4 Importância Médica.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 MATERIAL	37
4.2 MÉTODOS	37
4.2.1 Desenho dos iniciadores gene - específicos.....	37
4.2.2 Extração de RNA total.....	38
4.2.3 Síntese da primeira fita de cDNA.....	38
4.2.4 Amplificação de cDNA do Ag5	39
4.2.5 Clonagem.....	40
4.2.5.1 Reação de ligação de cDNA de Ag5 de <i>P. paulista</i> em vetor.....	40
4.2.5.2 Transformação	40
4.2.6 Análise por PCR das colônias recombinantes	41
4.2.7 Extração de DNA plasmidial ("mini-preps")	41
4.2.8 Análise dos clones recombinantes por restrição	41
4.2.9 Sequenciamento das amostras	41
4.2.10 Análise das sequências através de pesquisas no Banco de Dados.....	42
4.2.11 Análise imunológica a partir do veneno bruto de <i>P. paulista</i>	42

4.2.11.1 Eletroforese preparativa do veneno de <i>P. paulista</i> em gel denaturante de poliacrilamida.....	42
4.2.11.2 Dosagem de proteínas totais	43
4.2.11.3 Sensibilização sistêmica	43
4.2.11.4 Análise da especificidade dos anticorpos policlonais produzidos contra o Ag5 de <i>P. paulista</i> , e da ocorrência de reatividade cruzada contra venenos de insetos sociais (Hymenoptera)	44
4.2.11.5 Análise de <i>Western blotting</i>	44
4.2.11.6 Imunodeteção	45
4.2.12 Análise do modelo estrutural de Ag5	46
4.2.13 Análise da Filogenia com base nos dados de sequências obtidos	46
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Extração de RNA total.....	48
5.2 Síntese do cDNA.....	49
5.3 Amplificação da sequência de cDNA do gene Ag 5	49
5.4 Clonagem de cDNA de Ag5: análise e sequenciamento dos clones recombinantes	50
5.5 Análise das sequências de nucleotídeos do Ag5 de <i>P. paulista</i> obtidas	51
5.6 Análise das sequências de aminoácidos	53
5.7 Eletroforese preparativa de extrato de veneno bruto de <i>P. paulista</i> em gel denaturante de poliacrilamida.....	58
5.8 Análise imunológica: Especificidade e reatividade cruzada dos anticorpos policlonais produzidos contra a fração de Ag5 do veneno bruto de <i>P. paulista</i>	59
5.9 Modelagem e análise da estrutura tridimensional do alérgeno Ag5 do veneno da vespa social <i>P. paulista</i>	61
5.9.1 Análise das regiões potencialmente imunogênicas (epítomos) encontradas no modelo estrutural de Ag5 de <i>P. paulista</i>	66
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES.....	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Introdução

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A ordem Hymenoptera compreende as maiores famílias dentre os insetos. Possui interesse clínico significativo, uma vez que muitos envenenamentos de importância médica são causados por membros pertencentes às famílias Vespidae (vespas, vespões e marimbondos), Formicidae (formigas) e Apidae (abelhas e mamangavas) (HOFFMAN, JACOBSON, 1996; HOFFMAN, 2006; AGUIAR, 2006).

Polybia paulista ou popularmente “paulistinha” é uma vespa social da família Vespidae, a qual possui hábitos urbanos e grande ocorrência no Sudeste do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo e Minas Gerais, onde tem sido responsável por muitos acidentes. A proteína alergênica Ag5 faz parte da composição do veneno desta vespa, e embora sua função biológica ainda seja desconhecida, este alérgeno é responsável por reações imunológicas cruzadas com o Ag5 do veneno de outros insetos sociais e proteínas eucarióticas de diferentes fontes (PADAVATTAN, et al., 2008).

Acidentes causados por esses insetos ocorrem frequentemente com seres humanos pela incidência de reações tóxicas ou alérgicas, devido aos componentes dos venenos (LANGLEY, MORROW, 1997; LANGLEY, 2005; MÜLLER, 2010). No Brasil, os acidentes mais graves ocorrem principalmente com abelhas (*Apis mellifera*), vespas (*Polistes* spp.) e mamangavas (*Bombus* spp.) (CARDOSO et al., 2003).

Os venenos de vespas sociais são constituídos por misturas complexas de aminas biogênicas, peptídeos e proteínas (e/ou enzimas) sintetizadas como moléculas precursoras (GMACHL, KREIL, 1995; HOFFMAN, 2006). Estes elementos apresentam propriedades farmacológicas e alergênicas (EINARSSON, MOBERG, 1981). Dependendo do grau de sensibilidade imunológica da vítima e do número de ferroadas (ou quantidade de veneno injetado) podem ocorrer reações fatais.

A importância da reatividade cruzada em pacientes alérgicos ao veneno de vespas sociais é inquestionável, pois estas interações têm impacto direto sobre o diagnóstico e a seleção da melhor conduta terapêutica, cuja finalidade maior é a de neutralização das reações alérgicas das vítimas de venenos das diferentes espécies.

A caracterização imunológica de um alérgeno pode ser realizada a partir da produção de anticorpos policlonais contra este antígeno, os quais são simples e

relativamente baratos de serem produzidos e totalmente úteis na detecção dos epítomos de diferentes antígenos (NELSON et al., 2000).

Usualmente os diagnósticos de alergia são baseados na detecção de IgE específica ao veneno, na pele e/ou no sangue do indivíduo alérgico. No entanto, às vezes eles são dificultados por respostas falso-negativas que podem ocorrer em função da baixa quantidade de IgE detectado, pelo baixo nível de sensibilidade do teste aplicado (RAST), ou ainda por respostas falso-positivas, devido à reatividade cruzada, com alérgenos de diferentes venenos, cujos epítomos possuem conformações similares, impossibilitando diferenciação pelas células B-1. Sendo assim, é importante o estudo e a caracterização de diferentes componentes protéicos de venenos de insetos para que seja possível a melhoria dos métodos diagnósticos proporcionando um entendimento mais preciso tanto dos padrões de especificidade como de imunoreatividade cruzada entre os diferentes alérgenos (MÜLLER, 2002; MÜLLER, 2010).

Neste trabalho, por meio de técnicas moleculares, foram determinados e analisados a sequência completa de cDNA do alérgeno Ag5 de *P. paulista* e o modelo de sua estrutura protéica tridimensional, com ênfase na compreensão e caracterização de suas propriedades imunológicas e na obtenção de dados sobre a imunorreatividade cruzada deste alérgeno com venenos de outros insetos sociais. Os resultados puderam ser validados pela produção de anticorpos policlonais contra este antígeno e testes de *Western blotting*. Assim as análises aqui realizadas vêm contribuir com a possibilidade de utilização do Ag5 do veneno de *P. Paulista*, como uma nova ferramenta para prevenção, terapia e diagnóstico de alergia a este veneno.

Objetivos

2 OBJETIVOS

- Determinar a sequência completa de cDNA do alérgeno Ag5 do veneno de *P. paulista* e obter o modelo da estrutura protéica tridimensional a fim de identificar seus possíveis epítomos de reconhecimento imunogênico;
- Produzir anticorpos policlonais em camundongos contra o Ag5 na forma natural;
- Testar e comparar a identidade imunológica dos anticorpos policlonais anti-Ag5 natural de *P. paulista* contra o próprio componente presente no extrato de veneno bruto desta vespa;
- Analisar a ocorrência de reação imunológica cruzada dos anticorpos policlonais contra o veneno bruto de outros insetos sociais.

Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ordem Hymenoptera, subordem Apocrita

Os Apocrita contêm a maior diversidade da Ordem, incluindo insetos de grande importância ecológica e benéfica ao homem, sendo classificados em dois grupos Parasítica e Aculeata.

O grupo Aculeata (Hymenoptera: Apocrita) abrange cerca de 100 mil espécies de abelhas, vespas e formigas. Somente nesta ordem são encontrados insetos com ferrão verdadeiro, uma característica das fêmeas que é derivado de um ovipositor, permitindo a perfuração da pele do hospedeiro, sendo então utilizado como uma arma para ataque e defesa (STEEN et al., 2005).

Os Aculeata, que normalmente interagem com o homem e envolvidos em alergia, pertencem às superfamílias Apoidea e Vespoidea, as quais incluem as famílias Apidae (abelhas), Vespidae (vespas) e Formicidae (formigas), (PIRPIGNANI et al., 2002), sendo que, como ocorre em outros países, no Brasil os acidentes com estes insetos são também muito frequentes. A família Vespidae é constituída por três subfamílias: Stenogastrinae, Vespinae e Polistinae, as quais são classificadas de acordo com o modo de fundação de suas colônias e o mecanismo de reprodução dos insetos (HOLLDÖBLER, WILSON, 1977). Nas subfamílias Polistinae e Stenogastrinae existem dois grupos: fundadoras de colônias independentes e fundadoras de colônias por enxames, enquanto que, na subfamília Vespinae, as fundadoras das colônias são as rainhas.

De acordo com Carpenter e Marques (2001), a subfamília Polistinae é constituída por três tribos: Polybini (também conhecida como Epiponini) Polistini e Mischocyttarini, as quais são encontradas no mundo inteiro, tendo uma maior diversidade em regiões tropicais, incluindo o Brasil com representantes de todas elas.

Dentro da tribo Polybini encontram-se as vespas do gênero *Polybia*. As vespas da família Polistinae estão entre as mais abundantes no mundo, sendo também as mais estudadas (RICHARDS, RICHARDS, 1951; RICHARDS, 1978; CARPENTER, MARQUES, 2001).

A tribo Polistini compreende um único gênero, *Polistes*, da mesma forma que a tribo Mischocyttarini, a qual é constituída somente pelo gênero *Mischocyttarus*.

No Brasil existem cerca de 500 espécies de vespas (SANTOS et al., 2007) e a composição do veneno de poucas delas tem sido devidamente caracterizada. Entre as espécies de maior importância e mais frequentes estão as dos gêneros *Polistes* (*P. simillimus*, *P. versicolor*, *P. lanio lanio*), *Polybia* (*P. paulista*, *P. ignobilis*) e *Agelaia* (*Agelaia pallipes pallipes*) (MANZOLI-PALMA, PALMA, 1992).

3.2 Aspectos da vespa social *P. paulista*

Pertencente à família Vespidae e popularmente conhecida como “paulistinha”, é uma vespa social e urbana, muito comum na região Sudeste do Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Estas vespas se adaptaram a áreas urbanas como refúgio, devido ao desmatamento das florestas (seu habitat natural), construindo seus ninhos em cidades junto às edificações humanas (**Figura 1**). Essa proximidade tem sido responsável pelo crescente número de acidentes registrados (AGUIAR 2006).

Esse tipo de vespa tem como características formar grandes colônias (mil a 5 mil indivíduos), construir e seus ninhos com vários favos usando materiais vegetais, que são coletados, triturados e umedecidos com secreção. Os ninhos são envolvidos por uma cobertura denominada envelope protetor com um único orifício de acesso, e é essa característica que diferencia as espécies do gênero *Polybia* das outras (AGUIAR, 2006). A sua alimentação é composta por proteínas (insetos), carboidratos (néctar), polpa de madeira e água (CASTRO, PALMA, 2009).

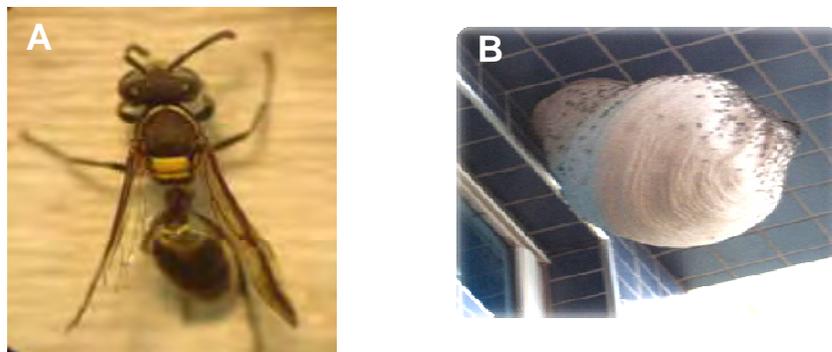


Figura 1. (A) Operária de *Polybia paulista* e (B) ninho de *P. paulista*. **Fonte:** (BROCHETTO-BRAGA, 2008; JACOMINI, 2009).

3.2 Acidentes com Hymenoptera sociais

Pelo fato de muitos dos Hymenoptera sociais terem se adaptado a áreas urbanas, por terem uma convivência mais próxima do homem, elas podem atacá-lo quando este representar voluntária ou involuntariamente uma ameaça. Segundo dados do Hospital das Clínicas em São Paulo, as vespas foram responsáveis por aproximadamente 32,6% dos acidentes, seguido pelas abelhas com 28,2% e pelas formigas 26,8%. Vale ressaltar, que o veneno de himenópteros causa fortes dores prolongadas, edemas, eritemas, reações alérgicas e sistêmicas (SOUZA, 2002).

A agressividade desses insetos faz parte do seu sistema de defesa e é estimulado por diversos fatores como movimentos bruscos, cheiro forte e cores escuras (CASTRO, PALMA, 2009).

O ferrão dos Aculeata é dividido em duas partes, uma formada por uma estrutura muscular e quitinosa, a qual é responsável pela introdução do ferrão e do veneno e, outra parte glandular, responsável por sintetizar e armazenar o veneno. A glândula de veneno apresenta diversas variações, mas frequentemente é constituída de dois filamentos excretores, um reservatório de veneno e um ducto que liga o reservatório ao ferrão (FUNASA, 2001).

O efeito causado pelo ferrão pode ser avaliado pelo seu tamanho, pela natureza e pela profundidade de inoculação do veneno. As ferroadas causam em seres humanos e animais diversas reações, podendo até levar à morte, embora as reações locais ocorram com maior frequência, na forma de inchaço, rubores e dor, podendo ser consideradas como intensas quando abrangem uma área no corpo da vítima, superior a 10 cm. Entretanto, para aqueles que são alérgicos aos componentes do veneno, podem ocorrer reações fatais ou outros eventos como urticária, pruridos locais, náuseas, vômitos, diarreias, angioedema, tontura, dores abdominais e falta de memória. No caso de múltiplas ferroadas, pode surgir reação tóxica ocasionando falta de ar e perda de consciência (HEINIG et al., 1988; DIDIER et al., 2005; TOMÉ et al., 2009). Em alguns casos, foram relatadas ocorrências de hemólise intravascular, inflamação hepática aguda, trombocitopenia, falência renal aguda, seguida de necrose tubular também aguda, paradas cardíacas e respiratórias e infarto do miocárdio (SHILKIN et al., 1972; BOUSQUET et al., 1984). Contudo, as mortes causadas por ferroadas de vespas nem

sempre estão relacionadas a reações alérgicas aos componentes do veneno e sim ao efeito tóxico (PALMA, 2006; SOUZA et al., 2005; MENDES et al., 2005).

O veneno injetado na vítima constitui um mecanismo de defesa da colônia que se sente ameaçada (PIEK, 1985). Pelo fato de existirem muitas pessoas sensíveis aos venenos de Hymenoptera e devido ao grande número de acidentes de importância médica o índice de sensibilidade na população (hemisfério norte) está estimado entre 9.3% e 28.5% (GOLDEN et al., 1997; ANTONICELII, et al., 2002). Estudos realizados em países europeus apontaram 20% das vítimas com sintomas alérgicos locais, 15% com reações sistêmicas e 17% assintomáticos, porém estes assintomáticos apresentaram testes positivos de IgE específica, pressupondo que numa próxima ocorrência de ferroadada, esses estarão dispostos a desenvolver reações alérgicas (NITTER-MARSZALSKA et al., 2004).

Os pacientes com reações locais têm risco inferior a 5% de desenvolverem uma reação sistêmica com contatos subsequentes, já os pacientes que desencadeiam reações sistêmicas graves, possuem risco calculado em 50%, de apresentar uma reação com gravidade semelhante em um próximo contato. Em populações expostas aos insetos, bem como, os apicultores e familiares, a prevalência das reações sistêmicas e da anafilaxia aumentam (TOMÉ et al., 2009). Para as pessoas acima de 40 anos, os fatores de risco para ocorrência de reações fatais estão provavelmente relacionadas à co-morbidade cardiovascular e ao local da ferroadada (cabeça ou pescoço). Em crianças 75 % das reações sistêmicas são moderadas e geralmente restritas a manifestações cutâneas (DIDIER et al., 2005).

3.3 Composição do veneno de Hymenoptera: propriedades bioquímicas, reações alérgicas e tóxicas

Os venenos de insetos como abelhas, vespas e vespões são compostos por misturas complexas de amins biogênicas, peptídeos básicos, proteínas e enzimas. Apresentam atividades farmacológicas causadas pelos peptídeos e alergênicas causadas pelas proteínas e enzimas (EINARSSON, MOBERG, 1981; MÜLLER, 2002; MÜLLER, 2010).

Venenos de vespas são muito ricos em peptídeos bem como, agentes neurotóxicos, hemolíticos e as cininas, as quais são caracterizadas como componentes neurotóxicos e causadores de dores que agem no gânglio nervoso, envolvido na locomoção e, por este motivo as vespas solitárias ferroam suas presas com o objetivo de imobilizá-las (PIEK et al., 1983; PIEK, 1987; SCHMIDT, 1982; LORENZI, 2002).

As proteínas e enzimas alergênicas dos venenos de insetos sociais são componentes de elevada massa molecular, sendo, as enzimas fosfolipases, hialuronidasas, lipases, esterases, fosfatases ácidas, proteases, a proteína antígeno 5 (Ag5, em vespas) e o peptídeo melitina (na forma tetramérica) encontrados nas abelhas, os principais alérgenos (OLIVEIRA, SCHEIDT, 2005). Tais componentes ficam armazenados nos reservatórios de veneno, até o ato da ferroadada, quando o veneno inicia fortes respostas imunes na vítima (HABERMANN, HARDT, 1972; KING et al., 1978). Estima-se que cerca de 1500 ferroadadas seriam necessárias para injetar uma dose letal de veneno num adulto de 70 Kg (GODDARD, 2003). Os vespídeos injetam uma quantidade de veneno pequena, cerca de 10 µg, entretanto, uma só ferroadada pode causar sérias reações alérgicas nos indivíduos hipersensíveis (KING et al., 1996).

A alergia decorrente das ferroadadas desses insetos causam preocupações para os profissionais da saúde pelo forte potencial de eventos fatais ocasionando um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes hipersensíveis. Essas reações ocorrem em qualquer idade, acometendo mais o sexo masculino e adulto, sendo esse fato provavelmente relacionado à exposição a esses insetos (CASTRO, PALMA, 2009).

As reações alérgicas manifestadas como reações locais, tóxicas, reações sistêmicas ou com sintomas de alergia tipo imediata (anafilaxia) (PRZYBILLA, RUËFF, 2010) são o resultado da combinação dos alérgenos com mastócitos e anticorpos IgE, causando uma cascata de liberação de mediadores como histamina, leucotrienos, enzimas, peptídeos e ativador de plaquetas, os quais, desencadeiam diversos efeitos (HOFFMAN, JACOBSON 1996). Uma vez surgida, a reação alérgica ao veneno por meio das ferroadadas, o risco de nova manifestação do processo alérgico é alto. Os estudos moleculares, os quais identificam os epítomos imunogênicos dos alérgenos são muito importantes, pois identificam as regiões da molécula do alérgeno, que interagem com os anticorpos da pessoa sensibilizada (BREITENEDER et al., 1999).

Pacientes alérgicos apresentam na maioria das vezes sensibilidade para vários venenos indicando que a sensibilização por um deles pode levar ao surgimento de sensibilidade a diversos outros venenos de insetos, e essa ação é denominada reatividade cruzada, a qual ocorre pelo reconhecimento de um mesmo epítopo, por dois ou mais anticorpos (PADAVATTAN, et al., 2008).

A detecção de IgE específica ao veneno é muito importante para os diagnósticos das reações alérgicas e devido aos resultados falso/negativos, muitas vezes encontrados, outros métodos de diagnósticos mais precisos e eficientes têm sido utilizados como o de *Western blot*, por apresentar sensibilidade e especificidade de 90% em seus resultados (GRANSTRON et al., 1994; SCARRATT et al., 1998). Estudos recentes indicam que todas as técnicas têm suas limitações, seja com os alérgenos recombinantes ou com outras técnicas como citometria de fluxo. No entanto a imunoterapia é eficaz na maioria dos pacientes que sofrem de alergia ao veneno, porém falhas no tratamento ocorrem, podendo causar efeitos colaterais de alergia (DIDIER et al., 2005).

Entre os alérgenos dos venenos de insetos, a fosfolipase (PLA) se encontra em maior proporção, sendo também de maior importância. O papel dessa enzima é hidrolisar fosfolipídios, gerando produtos bioativos, que agem como solubilizadores de membrana, cofatores enzimáticos ou como segundo mensageiro (RADIN, 2003). A reatividade cruzada entre as fosfolipases geralmente segue um padrão filogenético, sendo que, evolutivamente, as mais próximas apresentam maior identidade de sequências, e assim, maior reatividade cruzada entre elas do que entre as mais distantes (HOFFMAN, 2006).

A enzima hialuronidase é responsável pela hidrólise do 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. As propriedades adesivas do ácido hialurônico permitem a união das células nos tecidos, preenchendo os interstícios celulares. A hialuronidase é conhecida como “fator de difusão” pelo fato de que, quando o ácido hialurônico é hidrolisado através da ação desta enzima, o polímero é fragmentado ficando menos viscoso, permitindo assim

a difusão dos componentes do veneno mais rapidamente pelo espaço intersticial (DOTIMAS, HIDER, 1987; HOFFMAN, 2006).

As fosfatases são encontradas em grande quantidade em venenos de abelhas. Essas enzimas também atuam como alérgenos importantes (SCHMIDT et al., 1986). O veneno da vespa *P. paulista*, apresenta os dois tipos de atividades de fosfatase, a atividade ácida e a alcalina (OLIVEIRA, 1994).

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

As proteases ainda têm sido pouco caracterizadas em venenos de insetos sociais (SCHMIDT, 1982; DOTIMAS, HIDER, 1987; BANKS, SHIPOLINI, 1986). A maioria desses venenos não contém quantidades significantes de proteases, porém, uma alta atividade já foi constatada no veneno de uma vespa social *Polistes infuscatus*, no de uma formiga *Eciton burchelli* e no de uma espécie de abelha *Bombus pennsylvanicus* (SCHMIDT et al., 1986; HOFFMAN, JACOBSON, 1996). As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, e o termo “peptidases” pode ser utilizado para denominar qualquer enzima que hidrolisa este tipo de ligação (VERMELHO, 2008).

Antígeno 5

O Ag5, já descrito em venenos de 19 diferentes espécies de vespas, é um dos componentes mais importantes, cuja estrutura primária e comportamento imunológico têm sido extensivamente estudado entre os demais alérgenos (HOFFMAN, 2006).

Esse alérgeno é um membro de uma superfamília composta de proteínas ricas em resíduos de cisteína, apresentando massa molecular em torno de 23 kDa (KING et al., 1990) a 25 kDa (KISCHNICK et al., 2006). No veneno de *P. paulista*, Santos (2007) detectou a presença de cinco isoformas de Ag5 as quais apresentam massas moleculares em torno de 12, 16, 18, 22 e 26 kDa.

Nos venenos das vespas o Ag5 corresponde cerca de 8% do conteúdo total e cerca de 2% nos venenos das formigas, sendo sua atividade catalítica desconhecida (CASTRO, PALMA, 2009).

Tem sido caracterizado como um membro das famílias de proteínas conservadas tais como, as encontradas em (a) eucariotos (inclusive em leveduras), (b) em venenos de répteis; (c) entre as proteínas de defesa contra a patogenicidade em plantas ou outra resposta ao estresse (PR, PR-1) como as encontradas na folha de tabaco e no tomate (P14-A-PRPs); (d) as proteínas secretadas de parasitos nematoides (*Necator americanus*) como ancilostomídeos (SP-2); (e) as proteínas ricas em cisteína (CRISP), específicas de órgão reprodutores de mamíferos (TPX-1), compreendendo três domínios: N-terminal do domínio PR, uma região dobradiça e um domínio C-terminal rico em cisteína (PADAVATTAN, et. al., 2008). Proteínas relacionadas ao Ag5 também são encontradas em células glia de tumores cerebrais (HOFFMAN, 2006). De acordo com Milne et al. (2003), o Ag5 pode-se tratar de uma protease, pois apresenta grande similaridade de sequência com a protease do veneno de um caracol da família Conidae.

Em venenos de vespas, a proteína não enzimática Ag5 tem sido relatada com cerca de 200 a 300 aminoácidos (exemplos em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>: - *Polybia scutellaris*: 620 pb e 205 aa; *Polistes exclamans*: 700 pb e 227 aa e *Polistes annularis*: 830 pb e 209 aa) (KING et al., 1978, 1996; KING, 2000; HENRIKSEN et al., 2001; SKOV et al., 2006). No entanto, é o componente mais alergênico do veneno de vespas, superando as enzimas hialuronidasas, fosfolipases e fosfatases ácidas (NAKAJIMA, 1986). Esta proteína faz parte apenas dos venenos das vespas sociais e das formigas *Solenopsis* (“lava-pés”) e, provavelmente é responsável por provocar dor forte e uma resposta inflamatória local (PIEK, 1984; PADAVATTAN, et al., 2008).

Do mesmo modo como ocorre com as fosfolipases de veneno de vespas, as reações imunológicas cruzadas entre os Ag5 de vespas seguem um padrão filogenético, de acordo com o grau de parentesco e o nível de homologia das sequências, desde que, quanto maior a similaridade, maior o grau de reação cruzada (PADAVATTAN, et al., 2008). Contudo, nenhum dos pacientes estudados, até o momento, demonstrou IgE relacionado à atividade cruzada entre o Ag5 de *V. vulgaris* e Sol i 3 (alérgeno de *Solenopsis invicta* similar ao Ag5), os quais apresentam 44% de similaridade da sequência de aminoácidos (PADAVATTAN, et al., 2008). O fato das proteínas homólogas de Ag5 encontradas em venenos de formigas “lava-pés” não

exibirem reatividade antigênica cruzada com a mesma proteína em veneno de vespídeos é um resultado consistente com baixo o grau de conservação da estrutura protéica e do comprimento dos *loops* nestes alérgenos. Entretanto alguma reatividade cruzada tem sido observada entre os Ag5 de vespídeos e as moléculas homólogas de outros animais com as famílias das proteínas CRISP (HOFFMAN, 2006). Müller et al. (2008) também observaram reatividade cruzada em soro humano, entre os alérgenos de veneno Ag5 da *V. vulgaris* e as proteínas do testículo de mamíferos pertencentes à família das proteínas secretoras ricas em cisteínas (hCRISP).

As alergias causadas pelos venenos dos insetos sociais podem ser ocasionadas por um agente específico ou por uma molécula, cuja estrutura é similar a algum agente imunogênico, desencadeando uma resposta imunológica no indivíduo afetado. A reatividade cruzada entre os diversos alérgenos está relacionada às sequências primárias, uma vez que os anticorpos são produzidos contra as regiões altamente conservadas (CASTRO, PALMA, 2009).

Pantera et al., (2003) demonstraram, através do alinhamento das sequências de aminoácidos do Ag5 de *Polistes gallicus* (espécie europeia) e *P. annularis* (espécie norte-americana), a existência de 85% de similaridade, sendo que, dentro do mesmo subgênero, a similaridade das sequências foi de 98%. Por este fato, sugeriram que a existência de epítomos específicos na molécula de Ag5 fosse devido às variações na sua superfície, o que, tem sido cada vez mais comprovado através da determinação das estruturas tridimensionais dos alérgenos, por análise de raios-X (TERWILLIGER, EISEBERG, 1982; SCOTT et al., 1990; HENRIKSEN et al., 2001; SCHMITD et al., 2003; MARKOVIĆ-HOUSLEY et al., 2000; PADAVATTAN, 2007) e/ou por estudos de modelagem das estruturas, como o que foi realizado neste trabalho.

O Ag5 do veneno da vespa *P. scutellaris* é uma variante com reduzida reatividade à IgE específica e atividade anafilática, porém é considerado um alérgeno importante a ser utilizado em imunoterapia de pacientes alérgicos para dessensibilização ao veneno de vespas sociais (PIRPIGNANI et al., 2002). Testes realizados em culturas de mastócitos de ratos com o veneno total da vespa *P. scutellaris*, bem como sua fração de alta massa molecular, demonstraram que estes extratos não foram capazes de provocar a degranulação dos mastócitos.

Adicionalmente a morfologia dos mastócitos manteve-se normal e o número de células que entraram em contato com o veneno foi idêntico ao do grupo controle, porém as células incubadas com o veneno de vespas do gênero *Polistes*, foram degranuladas. Além disso, os resultados obtidos através do teste ELISA, mostraram diferenças significativas quanto à produção de IgE induzidas pelos dois extratos. Os camundongos imunizados com o veneno do gênero *Polistes*, mostraram um aumento de IgE específicos. Em contrapartida o nível de IgE permaneceu inalterado naqueles animais imunizados com o veneno de *P. scutellaris* (PIRPIGNANI et al., 2002).

O Ag5 de diversas espécies de vespas tem sido expresso como proteínas recombinantes em ambos os sistemas procariotos e eucariotos (VINZÓN et al. 2010).

Monsalve et al. (1999) mostraram que as proteínas de Ag5 de *V. vulgaris* e de *P. annularis* expressos em bactéria não foram obtidos nas formas corretamente dobradas, ou seja, com os epítomos descontínuos das células B, uma vez que a grande maioria dos anticorpos produzidos contra o Ag5 dos pacientes alérgicos são específicos para os epítomos descontínuos (conformacionais).

Estudos têm comprovado a eficiência da expressão de proteínas em levedura (*Pichia pastoris*), que é um sistema útil e complexo para os tipos de proteínas de eucarioto inferior até superior, pois permite a obtenção de maior rendimento, conformação adequada da proteína natural e modificações pós-translacionais (VINZÓN et al. 2010).

Assim, expressão do alérgeno Ag5 tem o potencial de fornecer grande quantidade desta molécula para uso em diagnósticos e terapias. Em geral, os alérgenos recombinantes são considerados como uma grande promessa de melhoria da imunoterapia de alérgenos específicos e diagnósticos *in vitro* de sensibilização alérgica (KISCHNICK et al., 2006).

3.4 Importância Médica

Desde o final dos anos 70, começou-se a fazer uso em larga escala, dos venenos de himenópteros, na forma de extrato bruto, para os casos de diagnósticos, dos tratamentos de reações alérgicas a ferroadas desses insetos e da produção de novos fármacos no combate de algumas doenças infecciosas e câncer, já que, alguns

dos componentes do veneno estão envolvidos em mecanismos que interferem em processos de sinalização celular (JOHANSSON et al., 2001; LORENZI, 2002; AGUIAR, 2006).

Portanto, há tempos observa-se um aumento significativo de interesse relacionado às propriedades bioquímicas e farmacológicas dos principais componentes alergênicos do veneno de insetos sociais, direcionado à área de alergia e imunologia clínica (ROSS et al., 2000).

A imunoterapia com os extratos de veneno dos insetos sociais é um tratamento altamente eficaz e mais utilizado em pacientes com histórico de anafilaxia, com o intuito de reduzir a morbidade e a mortalidade (VINZÓN et al., 2010). A imunoterapia específica é baseada nos resultados dos diagnósticos cutâneos e RAST os quais confirmam a presença de IgE, sendo que o objetivo do diagnóstico é classificar o tipo de reação e identificar o inseto responsável pelo acidente, de forma a se efetuar a aplicação correta do soro para neutralização.) (PRZYBILLA, RUËFF, 2010; VOVOLIS, MIKOS, KOUTSOSTATHIS, 2010). O risco de não ocorrer eficácia com o tratamento de imunoterapia específica com o extrato de veneno, se relaciona ao aparecimento de novas reações de gravidade variável. Ao mesmo tempo esse fato é contraditório, visto que, pacientes que manifestaram reações do tipo sistêmicas e que se opuseram a imunoterapia, perderam a sensibilidade na mesma proporção do que aqueles em tratamentos (BILÓ et al., 2005).

Diante de todas as informações expostas, este trabalho teve por finalidade caracterizar um dos alérgenos mais potentes do veneno da vespa social *P. paulista*, responsável por muitos acidentes na região sudeste do Brasil, visando assim contribuir com dados importantes para auxiliar na melhoria dos diagnósticos, imunoterapias e entendimento da reatividade cruzada, já que no Brasil esses estudos ainda são escassos.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Quatro ninhos de *P. paulista* foram coletados no período de 2009 a 2010 em diferentes estações do ano, no município e arredores de Rio Claro-SP-Brasil. As vespas vivas foram transportadas em sacos plásticos para o laboratório, e levadas à analgesia através de hipotermia a - 20°C, uma vez que são ectotérmicos. Para a extração de RNA foram utilizados os abdomens das vespas, os quais foram dissecados e retirados com bisturi e pinça, e a seguir imediatamente utilizados nos experimentos.

Para os testes imunológicos foram utilizados extratos protéicos feitos a partir das glândulas de veneno dissecadas de *P. paulista* e de outras espécies de vespas (*Polybia sericea*, *Polybia ignobilis* e *Agelaia pallipes pallipes*), de formiga (*Solenopsis invicta*) e de abelha (*Apis mellifera*).

Uma vez que os camundongos BALB/C são isogênicos foram utilizados, fêmeas (25g de peso em média) para sensibilização sistêmica no Biotério do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental do Departamento de Clínica Médica da UNICAMP, Campinas/SP coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner (Comitê de Ética em Pesquisa, UNICAMP Nº 187/2006).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenho dos iniciadores gene - específicos

Para o desenho dos iniciadores listados abaixo, fez-se a busca de sequências de nucleotídeos e/ou aminoácidos relativos ao alérgeno Ag5 em venenos de vespas altamente relacionadas (*P. scutellaris*, *P. annularis* e *P. dominulus*) disponíveis no Banco de Dados do GenBank (website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram alinhadas pelo programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), para verificação das regiões conservadas, as quais foram essenciais para o desenho dos iniciadores gene-específicos, que levaram à amplificação de fragmentos de 621 pb, que estão apresentados nas **tabelas 1 e 2**.

Tabela 1: Sequência de iniciadores específicos.

Iniciador	Sequência do Iniciador (5'-3')	Tamanho do Iniciador	Tamanho do Produto
Ag5 F (direto)	5'ATTGGCAGACTGTATGGAGAATC 3'	23 mer	621 pb
Ag5 R (Reverso)	5' ACCACTTGAGTGTA 3'	15 mer	

Tabela 2: Iniciadores do vetor pCR®8/GW/TOPO®.

Iniciador	Sequência do Iniciador (5'-3')	Tamanho do Iniciador
GW1 direto	5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC-3'	25mer
GW2 reverso	5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA-3'	25 mer

4.2.2 Extração de RNA total

Para cada reação foram utilizados 30 abdomens de *P. paulista*, e o RNA total extraído conforme o método do TRIzol, (Life Technol, Cat. N° 15596) com material fresco, obtido logo após o momento da coleta do ninho.

A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro, através da razão de absorbância 260/280 nm do produto final (diluído a 1: 500 em H₂O DEPC) e a integridade do RNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (40mM, 1mM de EDTA) feito com H₂O DEPC. O RNA obtido foi visualizado no gel pela coloração somente das amostras, com 1 µL de Blue green 1X (1 µL/5 µL de amostra).

4.2.3 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita por RT-PCR (Transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase), com o kit Super Script da Gibco-Life Technologies, e/

ou com o kit da Promega®, utilizando-se cerca de 1 µg de RNA total juntamente com iniciador oligo dT, de acordo com as orientações do protocolo. A eficiência dos resultados foi a mesma para os dois métodos testados.

4.2.4 Amplificação de cDNA do Ag5

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho Termociclador de Gradiente Eppendorff epgradiente, com a mistura “PCR Master Mix” (Qiagen) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante: 12,5 µL de “PCR Master Mix” (concentração final na reação: 0,625 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada nucleotídeo e 1,5 mM de MgCl₂); 0,4 µM dos iniciadores; 1 µL de cDNA (800-1000ng), água MQ (água ultrapura) para o volume final de 25 µL.

As melhores condições para a obtenção da sequência completa de cDNA de Ag5 foram: (1) temperatura de anelamento de 48,3° C e (2) concentração dos iniciadores Ag5 F/ Ag5 R de 0,4 µM. Os parâmetros utilizados estão na **Tabela 3**.

Tabela 3: Condições da obtenção do cDNA completo do alérgeno Ag5.

PCR		
Denaturação	95°C	5 min.
35 ciclos		
Denaturação	95°C	1 min.
Anelamento	48°C	1 min.
Extensão	72°C	3 min.
EXTENSÃO FINAL		
	72°C	15 min.
	4°C ∞	

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% em TAE 1X e visualizados com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green: amostra).

4.2.5 Clonagem

4.2.5.1 Reação de ligação de cDNA de Ag5 de *P. paulista* em vetor

Com base nos resultados obtidos, foi feita uma nova reação em maior volume (2 a 3 X o usual), sendo a banda referente ao produto de PCR gene-específico do Ag5, recortada e eluído do gel de agarose 1,5% de baixo ponto de fusão e, parte deste volume foi diretamente utilizado nas reações de ligação no vetor pCR®8/GW/TOPO®, conforme sugestão do manual da Invitrogen. Para a reação de ligação foram utilizados 2 µL do amplicon de Ag5 (50 ng), 1 µL do vetor pCR®8/GW/TOPO®, 1 µL de solução salina e 2 µL de água MQ sendo a mesma incubada, por 15min à temperatura ambiente, antes da etapa seguinte. Como controle da reação de ligação foi utilizado 1 µL do vetor pCR®8/GW/TOPO®, 4 µL de água MQ e 1 µL de solução salina.

4.2.5.2 Transformação

Após a reação de ligação foi feita a transformação em bactérias - *E. coli* One Shot® Mach1™-T1^R, quimicamente competentes, que acompanham o kit pCR®8/GW/TOPO® (Invitogen). Todas as reações controles indicadas, bem como, as reações experimentais seguiram as indicações prescritas no manual do produto. A reação de transformação contendo 2 µL da reação de ligação anterior e 50 µL da suspensão de bactérias One Shot® foi incubada por 20 minutos no gelo antes do choque térmico da amostra, a 42°C de 30 segundos se guido de gelo. A cada reação preparada, em tubo eppendorff, foram adicionados 250 µL do meio SOC (0.02 g/L de triptona, 0.005 g/L de extrato de levedura e 0.0005g/L de NaCl, com adição de 0,01 M de MgCl₂, 0,01M de MgSO₄ e 0,04% de glicose estéreis) à temperatura ambiente. O tubo eppendorff foi colocado em incubadora na posição horizontal, por 1hora a 37° C, com agitação de 220 rpm, e a seguir, diferentes volumes desta suspensão de bactérias transformadas foram aplicadas em placas de petri. O plaqueamento das bactérias foi testado com volumes de 20 µL a 130 µL das reações diluídas, em cerca de 25 mL de meio Luria-Bertani agar (Tryptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0% pH 7,0),

contendo X-gal (64 µg/mL) e espectinomicina (100 µg/mL – Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por no mínimo 24h antes das análises.

4.2.6 Análise por PCR das colônias recombinantes

Para seleção dos clones recombinantes, colônias brancas isoladas e uniformes (n=50) foram retiradas das placas com palitos estéreis e diretamente aplicadas em tubos de reação para análise por PCR descrito no item **4.2.4**.

4.2.7 Extração de DNA plasmidial (“mini-preps”)

Dos clones recombinantes selecionados foram preparadas culturas em 3 mL de meio líquido LB contendo o antibiótico espectinomicina a 100 µg/mL, com agitação de 225 rpm, a 37°C, durante 17 horas. As extrações de DNA plasmidial foram feitas com o kit QIAprep® Spin miniprep (Qiagen).

4.2.8 Análise dos clones recombinantes por restrição

Alíquotas cerca de 500 ng das preparações plasmidiais foram utilizadas em reações de restrição com a enzima EcoRI num volume final de 20 µL contendo: (20 U) da enzima e tampão EcoRI 1X e H₂O MQ. As reações foram incubadas por 3h a 37°C e após esse período analisadas em gel de agarose 1% em TAE 1X.

4.2.9 Sequenciamento das amostras

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi feito com as colaborações do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva - Depto. de Genética e Evolução, UFSCar - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) - em sequenciador MEGA BACE 1000 (Amershan Pharmacia Biotech), bem como do Prof. Dr. Vanderlei Martins do Centro de Estudos de Insetos Sociais-CEIS, UNESP-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em sequenciador Applied Biosystems 3737, usando-se dideoxynucleotídeos.

4.2.10 Análise das sequências através de pesquisas no Banco de Dados

Após a obtenção das sequências e através das análises pelo programa DNASTAR – Lasergene (Software for Sequence Analysis and Assembly) foi obtida a sequência consenso, a partir daí foram realizados: **(1)** o reconhecimento e retirada das sequências relacionadas ao vetor de clonagem pelo VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>); **(2)** análise do Frame correto para tradução da sequência de nucleotídeos no BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframeseq.html>); **(3)** análise da ORF pelo programa NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>); **(4)** busca de similaridade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos no GenBank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); **(5)** alinhamento de todas as sequências similares ao Ag5 de *P. paulista* encontradas pelo Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>); **(6)** árvore filogenética por meio do software DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution) versão 4.1(XIA e XIE, 2001) e **(7)** determinação dos domínios protéicos conservados Programa CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

4.2.11 Análise imunológica a partir do veneno bruto de *P. paulista*

4.2.11.1 Eletroforese preparativa do veneno de *P. paulista* em gel denaturante de poliacrilamida

Para análise e separação das proteínas totais do veneno de *P. paulista*, o extrato bruto, preparado a partir de 1000 glândulas, foi submetido à eletroforese em gel preparativo de gradiente (10-18%) de poliacrilamida, sob condições denaturantes (sistema alcalino Tris-Glicina/Tris-HCl na presença de SDS- dodecil sulfato de sódio, segundo Hames, Rickwood (1990).

A banda protéica encontrada na região de massa molecular de 25 kDa, similar ao descrito na literatura para o alérgeno do Ag5, foi recortada do gel e utilizada para a sensibilização sistêmica, conforme descrito a seguir.

4.2.11.2 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas presentes nos extratos de veneno foi determinada pelo método de Coomassie Blue “binding” descrita por Sedmak e Grossberg (1977), utilizando-se albumina bovina como padrão

4.2.11.3 Sensibilização sistêmica

A sensibilização sistêmica em fêmeas de camundongos BALB/C foi realizada no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental do Departamento de Clínica Médica da UNICAMP-Campinas-SP-Brasil, coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner.

Os animais foram aclimatados durante 2 semanas antes das imunizações e utilizados somente após 6 semanas. Para o inóculo foram utilizados 5 camundongos Balb/C (fêmeas pesando 25g em média) mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF) sendo 4 animais para a amostra e 1 para o controle. A banda da fração de Ag5, recortada do gel, foi macerada em soro fisiológico estéril e o volume final obtido (~1,8 mL) foi dividido em 4 tubos eppendorfs (quaduplicatas) que foram utilizados para as aplicações no grupo experimental. No controle, foram feitas apenas injeções de macerado de gel de poliacrilamida sem qualquer amostra, em soro fisiológico. O protocolo de imunização foi realizado nos dias 0; 7;14 e 21 dias, sendo que: - no primeiro dia, em cada animal, foi injetado o volume equivalente a 200 µL dividido em 4 pontos no dorso; - nos demais dias, cada animal recebeu aplicação de 100uL dos macerados. No 30º dia, foi realizada a punção cardíaca para coleta de sangue e teste da produção de anticorpo.

Uma estimativa do conteúdo protéico, presente na fração injetada, foi realizada a partir da concentração do extrato de veneno aplicada no gel (10mg de proteínas totais), levando-se em conta a porcentagem relativa de 8% de Ag5 em veneno de vespas (CASTRO, PALMA, 2009). Desta forma, estima-se que cada animal tenha sido imunizado com cerca de 200 µg da fração eletroforética de Ag5 do veneno de *P. paulista*.

4.2.11.4 Análise da especificidade dos anticorpos policlonais produzidos contra o Ag5 de *P. paulista*, e da ocorrência de reatividade cruzada contra venenos de insetos sociais (Hymenoptera)

Glândulas de veneno totalmente limpas dos aparelhos de ferroar provenientes de *P. paulista* (n=100), *P. sericea* (n=30), *P. ignobilis* (n=30), *P. lanio lanio* (n=15), *A. pallipes pallipes* (n=35), *A. mellifera* (n=60) e *S. invicta* (n=160), foram removidas por dissecação à baixa temperatura, rapidamente lavadas em água destilada, a 4°C, e a seguir, estocadas a -20°C ou logo utilizadas para esta análise.

A preparação dos extratos de veneno foi feita através da resuspensão das glândulas em água destilada, seguido de leve pressão com bastões de polietileno autoclaváveis de ponta fina, para que ocorresse descongelamento e rompimento, com consequente liberação do veneno em solução. As suspensões foram centrifugadas por 5 min, 14000 xg, 4°C, sendo os precipitados descartados e os sobrenadantes utilizados como fonte de proteínas, que foram submetidas à eletroforese em gel de 10% de poliacrilamida.

De cada um dos extratos foram aplicadas 80 µg de proteínas/canaleta do gel e como referência, tanto para a massa molecular das bandas, bem como para a eficiência da eletrotransferência, foi utilizado um padrão pré-corado de proteínas na faixa de 12000 a 225000 Da (Amersham High-Range Rainbow Molecular Weight Markers-GE Healthcare- cod RPN 756E). As corridas foram realizadas a 75 V no gel de empilhamento e 100-110 V no gel de resolução num período de 2 horas.

4.2.11.5 Análise de *Western blotting*

Após a coleta dos soros de camundongos imunizados com a fração eletroforética protéica, de 25 kDa, do veneno de *P. paulista* conforme descrito acima, foram realizados os experimentos de imunodeteção por *Western blotting*.

As proteínas totais dos extratos dos venenos de diferentes insetos, separadas por SDS-PAGE 10% foram eletrotransferidas a 0,8 mA/cm² do gel para membranas de nitrocelulose, utilizando-se o sistema semi-seco (eletrodos de grafite) NovaBlot Unit do aparelho Multiphor II (Pharmacia Biotech). Para este procedimento, logo após a corrida,

o gel foi medido (largura e altura) para corte da membrana de nitrocelulose e dos papéis de filtro (Whatman 3 MM 1,0 mm espessura- 6 pedaços/gel) utilizados como cátodo e ânodo. A seguir, o gel, a membrana e os papéis de filtro foram embebidos separadamente por poucos minutos em tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM a pH 8.3, SDS a 0,2% e metanol a 20%). Sobre o ânodo de grafite, pré-saturado com água destilada, foi montado o “sanduíche” de transferência na ordem: 3 folhas de papel de filtro, membrana, gel, mais 3 folhas de papel de filtro e sobre estas o eletrodo cátodo de grafite também pré-saturado com água destilada. Com base no tamanho do gel, os parâmetros de transferência ficaram ao redor de 60 V, 30-34 mA por 2 horas. A eficiência da eletrotransferência pode ser confirmada pela visualização do padrão de proteínas pré-corado transferido para a membrana e pela coloração posterior do gel transferido com Coomassie Blue G-250 a 0,2% diluído em solução de metanol 45% e ácido acético a 10%, por 20 minutos à temperatura ambiente.

4.2.11.6 Imunodeteção

A membrana de nitrocelulose teve seus sítios inespecíficos bloqueados com solução de bloqueio TBS-T (tampão Tris-Cl 1M pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl e Tween-20 a 0,05%) acrescida de leite em pó desnatado a 1% (m/v) por 2 horas. Logo após, as membranas passaram por 3 lavagens de 5 minutos cada uma, à temperatura ambiente, com a solução de TBS-T e a seguir, incubadas com o soro total do animal, previamente diluída (1:1000 ou no caso, 10 µL/10 mL) na solução de bloqueio, sob agitação bem lenta a 4°C durante a noite. As membranas foram submetidas a 3 lavagens com a solução de TBS-T e após isso, foram incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich A-3688) diluído a 1:5000 (2 µL em 10 mL da solução de bloqueio) por exatamente 2 horas em temperatura ambiente sob agitação lenta e posteriormente, por mais 3 lavagens com a solução de TBS-T. A revelação do resultado foi realizada com o sistema de substratos BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich, B1911) pela incubação das membranas com 10 mL da solução a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos.

4.2.12 Análise do modelo estrutural de Ag5

Modelos tridimensionais da proteína Ag5 de *P. paulista* foram construídos (n=500) com base na estrutura tridimensional do Ag5 da *V. vulgaris* (Ves v5) 1QNX (código do PDB-Protein Data Bank) em adequação às restrições espaciais da molécula, utilizando-se o programa Modeller versão 9.8 (SALI, BLUNDELL, 1993). Para visualização dos mesmos foi utilizado o programa PyMol Molecular Graphics System, versão 1.3 (DELANO, 1993) e a análise estereoquímica foi realizada pelo programa PROCHECK (LASKOWSKI, MACARTHUR, THORNTON, 1993).

4.2.13 Análise da Filogenia com base nos dados de sequências obtidos

Após o alinhamento (Programa *Multalin*) das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos para o alérgeno 5 de *P. paulista*, encontradas neste trabalho, com aquelas relatadas no veneno das outras espécies próximas de vespas e já depositadas no GenBank, foram contruídas árvores filogenéticas pelo método de *Neighbor Joining* usando-se como parâmetro as diferenças e similaridades entre estas sequências. O programa utilizado foi o de DAMBE (Data analysis in Molecular Biology and Evolution, versão 4.1) (XIA, XIE, 2001).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Extração de RNA total

A obtenção de cDNA bem como das sequências nucleotídicas de interesse são extremamente dependentes da qualidade do RNA extraído. O RNA é uma molécula susceptível à degradação e, a principal preocupação consiste na sua degradação por ribonucleases (RNAses) presentes em diversos materiais biológicos, desde que, são enzimas extremamente resistentes a vários tratamentos, inclusive os térmicos, tornando o processo de extração restrito a condições especiais.

Uma vez que, os insetos em geral contêm muitos microrganismos endógenos e conseqüentemente, muitas nucleases, a extração de RNA íntegro torna-se uma tarefa difícil. Desta forma, dos experimentos realizados, os melhores resultados foram aqueles em que após a dissecação e maceração das glândulas e/ou abdomens, as suspensões foram mantidos em Trizol a -85°C por 7 dias, antes da extração de RNA.

As concentrações de RNA total obtidas a partir de glândulas de veneno de *P. paulista* foram 300 a 2.928 ng/ μL e a razão de pureza das amostras a 260/280_{nm} ficaram entre 1,4 a 2,01. Na **Figura 2**, como exemplo, observa-se que as melhores amostras desta extração foram as das canaletas 2, 3, 4, 5, 7 e 8 devido a maior intensidade das bandas de RNAs de 28s e 18s em relação à de 5s (indicativo do baixo grau de degradação do RNA total extraído), enquanto que a qualidade da amostra 1 foi ruim.

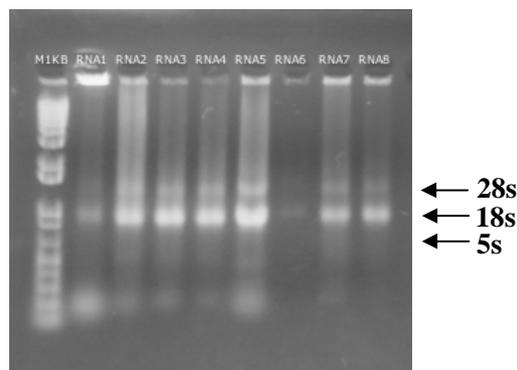


Figura 2. Perfil eletroforético de réplicas de amostras de RNA total, extraído de abdomens das vespas *P. paulista*, em gel de agarose a 2%, em TAE 1X (Sambrook et al., 1989). Nas canaletas **2 a 9**, foram aplicadas amostras de RNA referentes à extração dos materiais depois de no mínimo, 7 dias em TRIZOL a -85°C . **M** corresponde ao DNA *ladder* de 1kb (de 100 a 12.000 pb). Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green:amostra). As setas indicam as bandas de RNAs de 28s, 18s e 5s, utilizadas como parâmetro do grau da integridade das amostras.

5.2 Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir dos mRNAs 2, 3, 4, 5, 7 e 8 mostrados na **Figura 2**. O perfil eletroforético das amostras obtidas, está demonstrado na **Figura 3**, em que se observa a ocorrência de formação de rastros de fragmentos de cDNA num intervalo de alta massa molecular no qual as sequências esperadas esperadas de 600 pb correspondentes ao Ag5 poderiam ser encontradas.

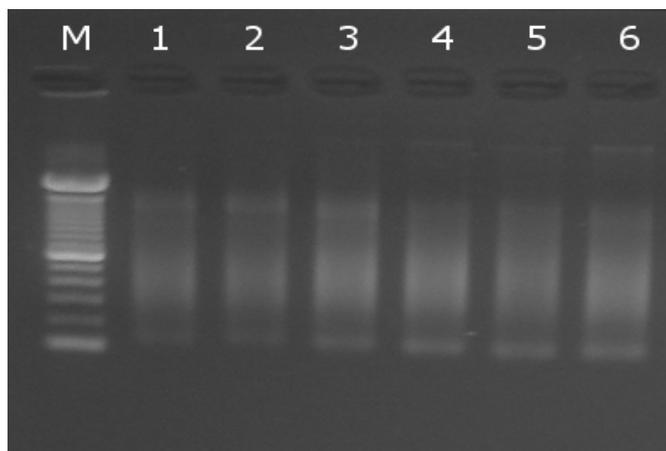


Figura 3. Perfil eletroforético de cDNA de *P. paulista* em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X. Nas canaletas de 1 a 6 estão as amostras de cDNA sintetizadas com a enzima RT- Improm (Promega). **M** corresponde ao padrão de DNA "ladder" de 1 kb. Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green:amostra).

5.3 Amplificação da sequência de cDNA do gene Ag 5

As melhores condições para obtenção do cDNA completo do alérgeno Ag5 foram: (1) temperatura de anelamento de 48,3°C e (2) concentração dos iniciadores Ag5 F/ Ag5 R de 0,4 µM. O produto esperado de 600 pb foi amplificado com sucesso, conforme pode ser observado na **Figura 4**.

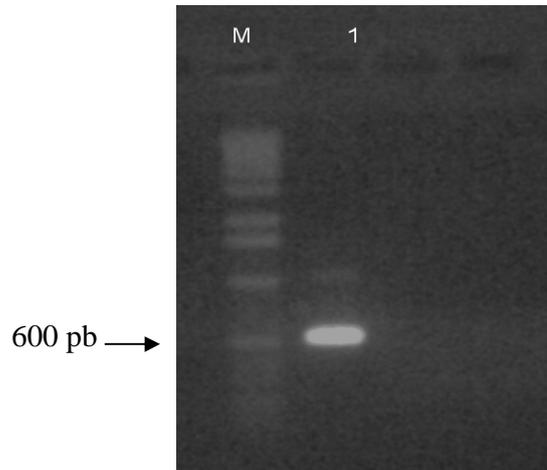


Figura 4. Banda de cDNA de 600 pb correspondente à sequência completa de Ag5 a qual foi amplificada à temperatura de anelamento de 48,3°C e concentração de 0,4 μ M de cada um dos iniciadores Ag5 F/Ag5 R. **M** refere-se ao DNA ladder de 1kb (de 100 a 12.000 pb). A análise foi realizada em gel de agarose 1%, TAE 1X e a amostra visualizada com Blue Green (1:5 v/v; corante: amostra).

5.4 Clonagem de cDNA de Ag5: análise e sequenciamento dos clones recombinantes

Seguindo-se a clonagem em vetor pCR®8/GW/TOPO® (**Mat. Mét. ítem 4.2.5.1**), obtivemos cerca de 50 clones por placa (n=4), sendo que do total, 15 foram selecionados e submetidos à análise por PCR. Destes, foram confirmados 8 e, na **Figura 5** têm-se o perfil eletroforético da análise de alguns deles, mostrando 6 clones com o inserto esperado. Os mesmos foram analisados por restrição com EcoR I o que confirmou a presença inserto de 600 pb (**Figura 6**). Estes clones recombinantes foram submetidos ao sequenciamento e analisados conforme descrito a seguir.

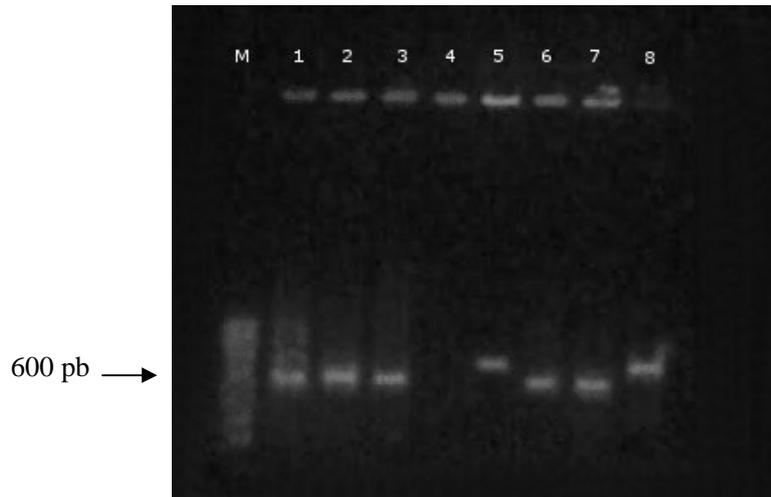


Figura 5. Resultado das análises (gel de agarose a 1% em TAE 1X) de algumas das colônias brancas recombinantes por PCR, utilizando-se o par de iniciadores Ag5 F/Ag5R, de acordo com as condições de reação previamente determinadas. **M** corresponde ao *ladder* de 100 pb (100 a 1000 pb). Observar que as canaletas 1, 2, 3, 6 e 7 contêm realmente a banda do tamanho esperado, correspondente ao Ag5.



Figura 6. Resultado das análises de restrição, com EcoR I, de oito amostras dos clones recombinantes (em gel de agarose a 1% em TAE 1X). Nas canaletas de 1 a 5 observam-se algumas amostras contendo o plasmídeo pCR®8/GW/TOPO® (2817 pb) não digerido em suas 3 configurações (relaxada, enrolada e super-enrolado, respectivamente de cima para baixo no gel) e, nas canaletas 6 a 13 amostras digeridas com a enzima, em que pode-se constatar o inserto de 600 pb. **M** corresponde ao *ladder* de 1 kb (Invitrogen 100-12000 pb). Todas as amostras foram visualizadas com Blue Green 1:5 (v/v; Blue Green: amostra).

5.5 Análise das sequências de nucleotídeos do Ag5 de *P. paulista* obtidas

Do sequenciamento dos 8 clones selecionados, apenas 8 sequências das 16 (direto e reverso) obtidas, mostraram-se adequadas, as quais, resultaram em um

consenso pelo *Software for Sequence Analysis and Assembly-DNASTAR®-Lasergene*, apresentado abaixo:

>Ag5 (621pb)

```
5' AATAAGAATTGTGTGAGAAAGCTTGCAGAAATTCGCCCTTATTGGCAGACTGTATGGAGAATCAACAAAACCAAGCA
GTAAATGTAATAAAGTAAGCATCACATCCGTTGGTGTAAACGGAAGAAGAGAAAAAATTAATCGTAGACGAGCATAATC
GATTTAGACAAAAAGTTGCACAGGGTTGGAAACCAGAGGTAATCCTGGACCACAGCCTGCTGCTTCGGACATGAATA
ATTTGGTATGGAACGATGAATTAGCTTATATCGCACAAAGTATGGGCCAGCCAATGCCAATTTTTTGTTCACGACAAAT
GCAGGAATACCGCACAATATCAAGTTGGACAAAATATAGCGTATTCAGCGAGCACCGCTGCGTACCCAGGTATTGTCA
GTCTAATCGTACTCTGGGAAAACGAAGTGAAAGATTTAACTATTCTCAAGGAATAACAAAAGAGAACCTTTTCTAAAG
TCGGCCATTACACTCAAGTGGTTGGGCTAAAAATAATTAGCACGGCGTGGGGAAATCATTTAATTCAAAAACTTA
CGCCAAACCGTATAAACTACACAAACATAGACCCGCTGGACACTTTAGGGGCCAACAAACAAAACAATAAAAAATAA
3'
```

A análise de Blast (bl2seq) desta sequência demonstrou maior similaridade com o Ag5 da vespa *P. scutellaris* (99%), seguido de *P. exclamans* (86%), *P. annularis* (86%) e *P. dominulus* (82%) conforme a **Figura 7**. Observar nesta figura que esta sequência completa de cDNA obtida apresentou 100% de similaridade com as sequências parciais dos clones 1.3 e 2.4 de Ag5, previamente depositadas no GenBank (GU573767 e GU562619).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY299635.1	<i>Polybia scutellaris</i> venom allergen 5 mRNA, partial cds	824	824	72%	0.0	99%
GU573767.1	<i>Polybia paulista</i> clone 2.4 venom allergen 5 mRNA, partial cds	782	782	68%	0.0	100%
GU562619.1	<i>Polybia paulista</i> clone 1.3 venom allergen 5 (Ag5) mRNA, partial cds	782	782	68%	0.0	100%
AY684929.1	<i>Polistes exclamans</i> allergen Pol e 5 precursor, mRNA, complete cds	477	477	72%	3e-131	86%
M98857.1	<i>Polistes annularis</i> venom allergen 5 mRNA, 3' end	477	477	72%	3e-131	86%
AY685030.1	<i>Polistes dominulus</i> allergen Pol d 5 precursor, mRNA, complete cds	375	375	71%	1e-100	82%

Figura 7: Análise de similaridade da sequência completa de cDNA do Ag5 de *P. paulista* com as sequências de outras espécies de vespas similares depositadas no Banco de Dados (GenBank). Observar maior similaridade (99%) com o mesmo alérgeno da vespa *P. scutellaris*.

Após a obtenção da sequência completa de cDNA do Ag5 de *P. paulista*, foi realizado alinhamento pelo Programa *Multalin*, com as sequências de nucleotídeos do Ag5 do veneno das outras espécies similares de vespas, depositadas no Banco de Dados e listados na **Figura 7**. Esse alinhamento confirmou que a sequência de Ag5 de *P. paulista* tem maior similaridade com a sequência do alérgeno de *P. scutellaris* (**Figura 8**).

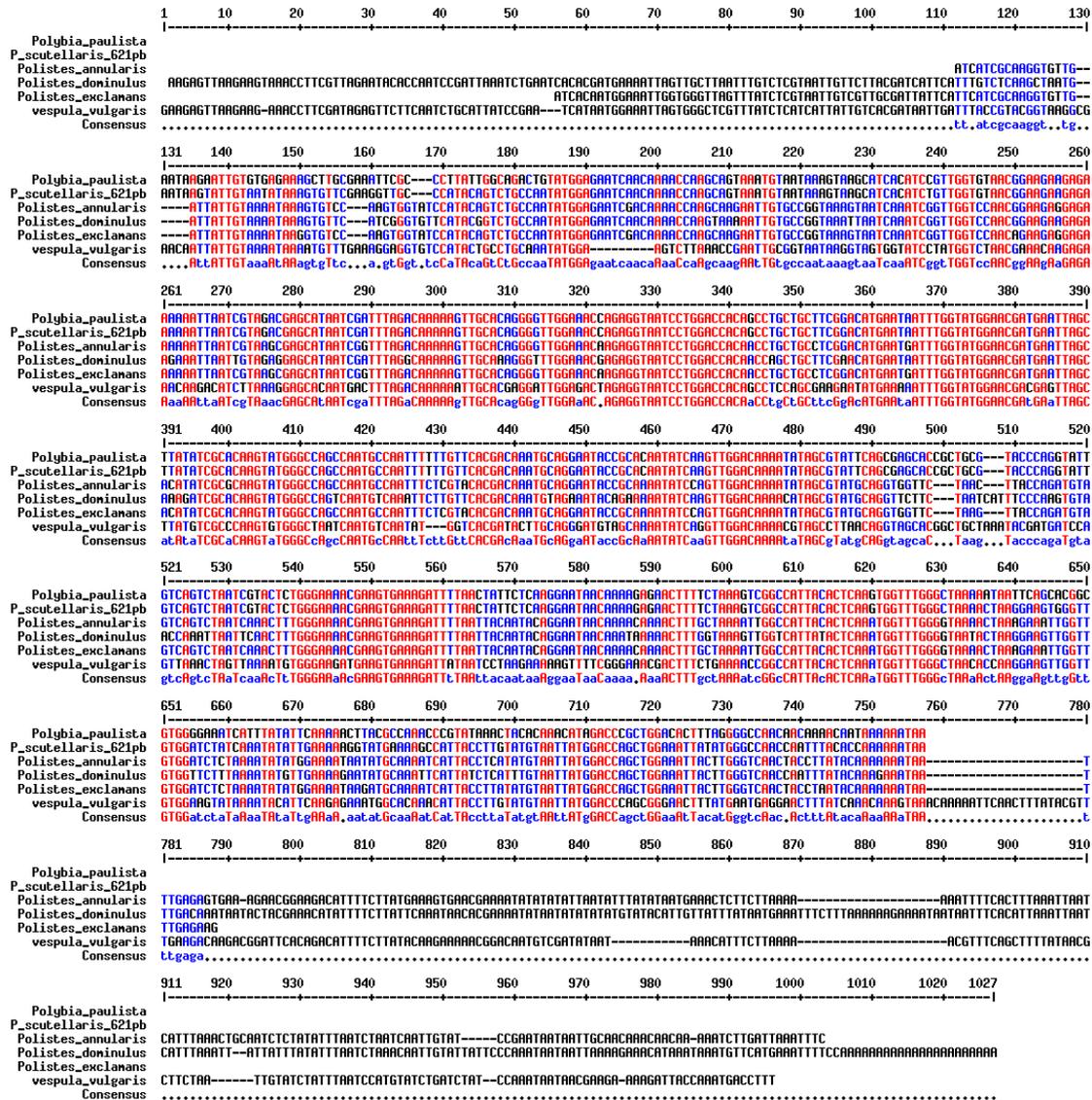


Figura 8. Alinhamento da sequência completa de cDNA do Ag5 do veneno de *P. paulista* com as sequências do mesmo alérgeno do veneno das vespas *P. scutellaris*, *P. exclamans*, *P. annularis*, *P. dominulus* e *V. vulgaris*. Programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-oulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

5.6 Análise das sequências de aminoácidos

A sequência completa de cDNA de Ag5 de *P. paulista* foi traduzida por meio do Programa BCM Search Launcher (“Six Frame Translation”), com fase de leitura no frame +1. No programa Multalin, o alinhamento das sequências de aminoácidos de Ag5 similares de outras vespas com a sequência completa de Ag5 de *P. paulista*, (determinada por estudos proteômicos por Santos, 2007) e a sequência traduzida,

neste estudo, demonstrou a existência de 42 resíduos de aminoácidos diferentes em relação à proteína de Ag5 determinada por Santos (2007).

Por outro lado, verifica-se a existência de uma região altamente conservada na sequência de aminoácidos do Ag5 (resíduos 60 a 140) em todas as espécies analisadas indicando tratar-se de uma molécula importante no veneno destes insetos. A proteína Ag5 de *P. paulista* encontrada apresenta 207 aminoácidos e massa molecular de 23.370,47 Daltons, sendo mais rica nos aminoácidos lisina, asparagina, valina, glutamina, treonina e serina. O resultado do alinhamento de aminoácidos pode ser observado na **Figura 9** que também estão demonstrados na forma de árvore filogenética (**Figura 10**).

>P_paulista_621pb, frame+1, 207 bases

NKNCVRKLAKFALIGRLYGESTKPPSSKCNKVSITSVGVTEEEKLIVDEHNRFRQKVAQGLETRGNPQPAAADMNN
 LVWNDELAYIAQVWASQCQFFVHDKCRNTAQYQVGNIAYSASTAAYPGIVSLIVLWENEVKDFNYSQGITKENFSKV
 GHYTQVVWAKNNSARRGEI IYIQKLT PNPYK LHKHRPAGHFGRGQQNNKK *

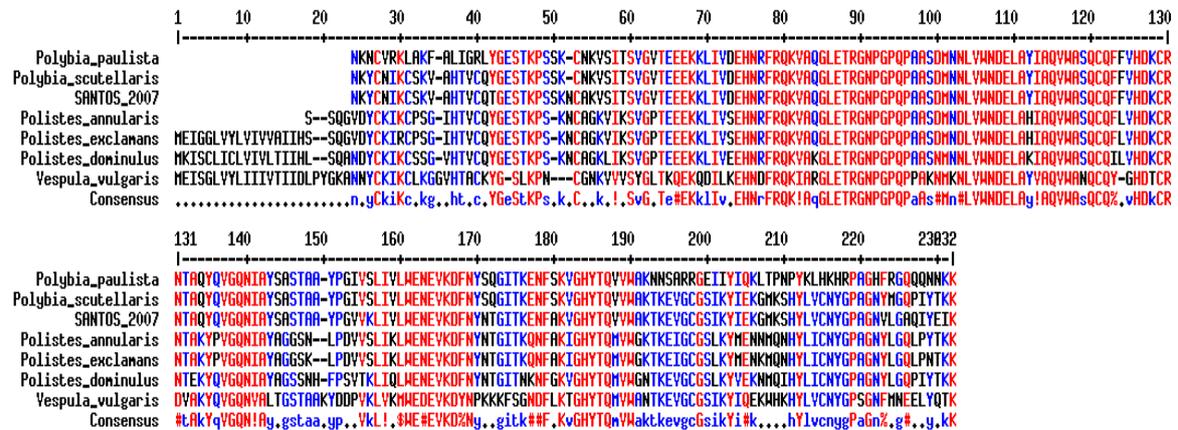


Figura 9. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Ag5 do veneno da vespa *P. paulista* obtidas deste trabalho com a mesma proteína obtida por estudos proteômicos (SANTOS, 2007) e, com as sequências de Ag5 de *P. scutellaris*, *P. annularis* e *P. exclamans*, *P. dominulus* e *V. vulgaris*. Programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-oulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

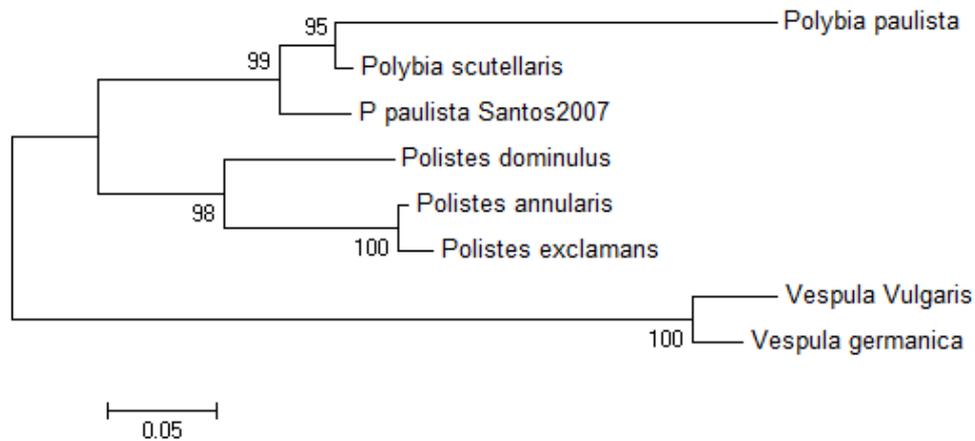


Figura 10. Árvore Filogenética das sequências de aminoácidos do alérgeno Ag5 do veneno de *P. paulista* com o Ag5 de outras vespas similares pela análise de *Neighbor Joining*. Os números mostrados nos ramos equivalem aos valores de *bootstrap* (1000 réplicas), encontrados pelo programa DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution) versão 4.1(XIA, XIE, 2001).

Pela análise da sequência de aminoácidos de Ag5 de *P. paulista* e diferentemente do que foi observado com relação à sequência de nucleotídeos, verifica-se que a proteína aqui obtida apresentou maior similaridade com a sequência de *P. scutellaris*. Por outro lado, conforme já dito, a sequência determinada por Santos (2007) apresenta diferentes aminoácidos em relação à sequência determinada em nosso laboratório.

A região aberta de leitura (ORF) da sequência de cDNA de Ag5, quando traduzida no frame +1, por meio do Programa *Orf Finder* foi encontrada na posição entre as bases 226 a 620 (num total de 396 pb), abrangendo os códons universais de início (ATG) e de terminação (TAG) (**Figura 11**), o que resulta numa proteína de 131 aminoácidos, bem similar à ORF de *P. scutellaris* que contém o mesmo tamanho com poucos aminoácidos diferentes.

>Ag5_Frame +1

```
MNNLVWNEDELAYIAQVWASQCQFFVHDKCRNTAQYQVGQNIAYSASTAAYPGIVSLIVLWENEVKDFNYS
QGITKENFSKVGHYTQVVWAKNNSARRGELIYIQKLTNPYPYKLNKHPAGHFRGQQQNNKK*
```

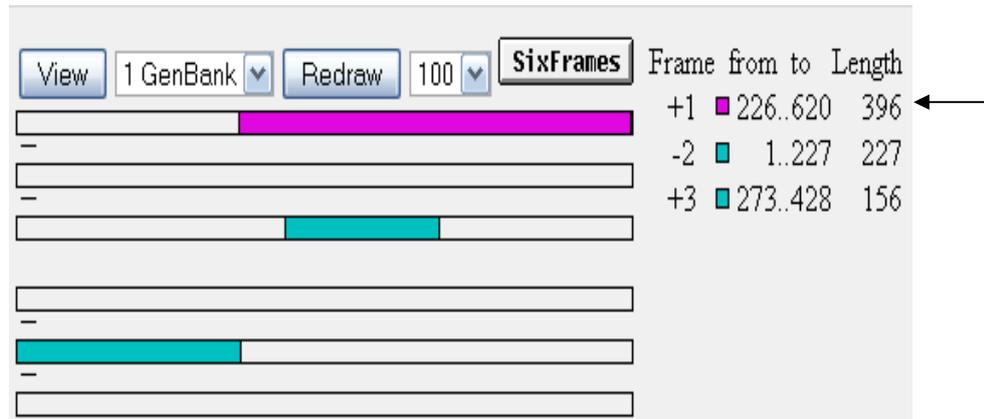


Figura 11. Determinação da região aberta de leitura (ORF) compreendida entre as bases 226 a 620 (total 132 pb) da sequência de cDNA de Ag5 de *P. paulista*, realizada pelo Programa *Orf Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) o qual resultou em uma proteína de 132 aminoácidos quando traduzida no frame +1.

A análise dos domínios protéicos conservados da proteína Ag5 de *P. paulista* foi realizada pelo Programa CDD. Esta análise permite classificar uma determinada proteína ainda desconhecida entre os grupos ou famílias de proteínas ou enzimas já cadastradas no Banco de Dados, cujas funções ou mecanismos de ação já tenham sido pesquisados no todo ou em parte. Assim, pode-se observar na **Figura 12** que a sequência de *P. paulista*, como as outras espécies de vespas, faz parte da família de proteínas extracelulares “SCP-like”, encontradas em eucariotos.



FIGURA 12. Alinhamento, feito pelo Programa NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), mostrando, respectivamente (de cima para baixo), os domínios conservados das seguintes proteínas: 1SMB_A = cadeia A da estrutura cristalina de uma Proteína humana associada ao complexo de Golgi, relacionada à PR-1 de patogênese em plantas; *query* = sequência Ag5 de *P. paulista* ; *gi 118361401* = proteína extracelular SCP-like de *Tetrahymena thermophila*; *gi 66269580* = proteína “venom allergen-like 1 de *Schistosoma mansoni*; *gi 71005370* = proteína hipotética UM01204.1 do fungo *Ustilago maydis* 521; *gi 126658530* = possível lipoproteína de cianobactéria *Cyanothece* sp. CCY0110; *gi 115379323*= proteína hipotética STIAU_7127 *Stigmatella aurantiaca*; *gi 39588579* = proteína hipotética CBG01188 do fungo *Caenorhabditis briggsae*. ; *gi 17540532* = proteína extracelular “SCP-like” (scl-10) do nematóide *Caenorhabditis elegans*. No esquema, a cor vermelha representa os resíduos de maior similaridade dos domínios, o azul, menor similaridade e o cinza representa ausência de similaridade entre os resíduos.

5.7 Eletroforese preparativa de extrato de veneno bruto de *P. paulista* em gel denaturante de poliacrilamida

O extrato bruto de veneno proveniente de glândulas de diversos indivíduos de *P. paulista* foi submetido à eletroforese denaturante de gradiente (10-18%) de poliacrilamida (**Figura 13**). O cálculo da massa molecular das bandas protéicas foi feito por meio da curva log PM versus coeficiente relativo de migração das bandas (Rf), utilizando como referência um padrão de proteínas de massa molecular conhecidas.

A finalidade deste experimento foi de obtermos um perfil eletroforético adequado de separação das bandas protéicas do veneno, e recorte daquelas de interesse (no caso a correspondente ao Ag5 de 25 kDa), seguido da imunização de camundongos para produção de anticorpos policlonais desta amostra.

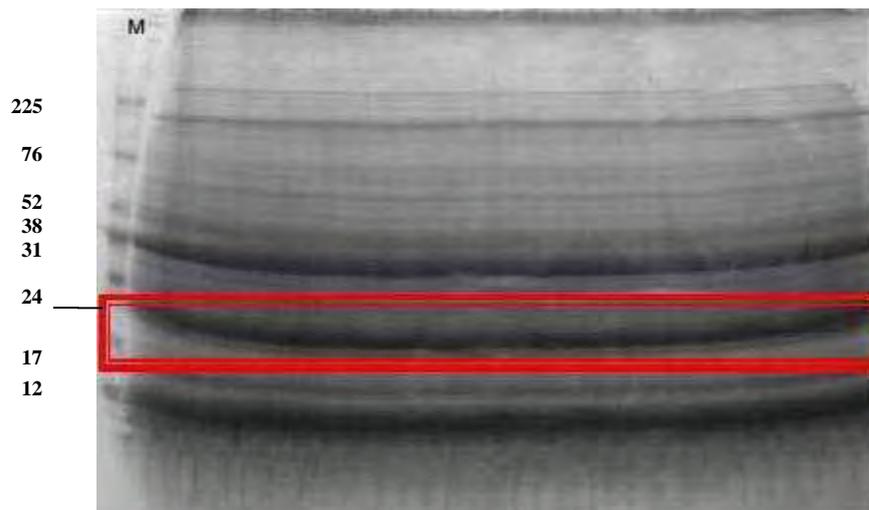


Figura 13. Perfil eletroforético do extrato bruto do veneno de *P. paulista* com cerca de 10 mg de proteínas totais, em gel preparativo de gradiente (10-18%) de poliacrilamida, sob condições denaturantes, do extrato bruto do veneno de *P. paulista* com cerca de 10 mg de proteínas totais. As bandas foram coradas com Coomassie Blue G-250 e em seguida a faixa de massa molecular 25 kDa foi recortada do gel. À esquerda tem-se um padrão protéico pré-corado de ampla variação em massas molecular e (12, 17, 24, 31, 38, 52, 76, e 225 kDa) que foi utilizado como referência para o cálculo da massa de cada banda no extrato de veneno.

5.8 Análise imunológica: Especificidade e reatividade cruzada dos anticorpos policlonais produzidos contra a fração de Ag5 do veneno bruto de *P. paulista*

O soro de camundongos imunizados com a fração eletroforética protéica relativa à massa molecular do alérgeno Ag5 no veneno de *P. paulista*, foi testada quanto à especificidade em relação ao reconhecimento à fração de 25 kDa no próprio extrato de veneno bruto de *P. paulista* e quanto à imunoreatividade cruzada com o veneno bruto de outros insetos, como das vespas: *P. sericea*, *P. ignobilis*, *A. pallipes pallipes*, *P. lanio lanio*; da abelha: *A. mellifera* e da espécie de formiga: *S. invicta*, previamente submetidos à eletroforese denaturante de poliacrilamida (10%).

A **Figura 14 (A, B)** apresenta o resultado do experimento de imunodeteccção realizado com o sistema cromogênico de Fosfatase Alcalina ligada ao anticorpo secundário-anti-IgG de camundongo.

Os resultados desta análise comprovaram a especificidade dos anticorpos produzidos contra a proteína Ag5 de *P. paulista*, uma vez que houve forte reação específica desses anticorpos, contra o antígeno detectado na região de 25 kDa na membrana, correspondente à localização do alérgeno Ag5. A deteccção de outra banda próxima à de 30 kDa nos venenos do gênero *Polybia* testados, pode ser devido a uma reação inespecífica ou o reconhecimento de alguma das isoformas comum entre eles. Ao mesmo tempo, os resultados também demonstraram que os mesmos anticorpos apresentaram diferentes níveis de reatividade cruzada com o alérgeno Ag5, e suas possíveis isoformas, no veneno das vespas *P. ignobilis* e *P. sericea*. Entretanto, não se observou reação cruzada com os venenos de *S. invicta*, *A. pallipes pallipes*, *P. lanio lanio* e *A. mellifera*.

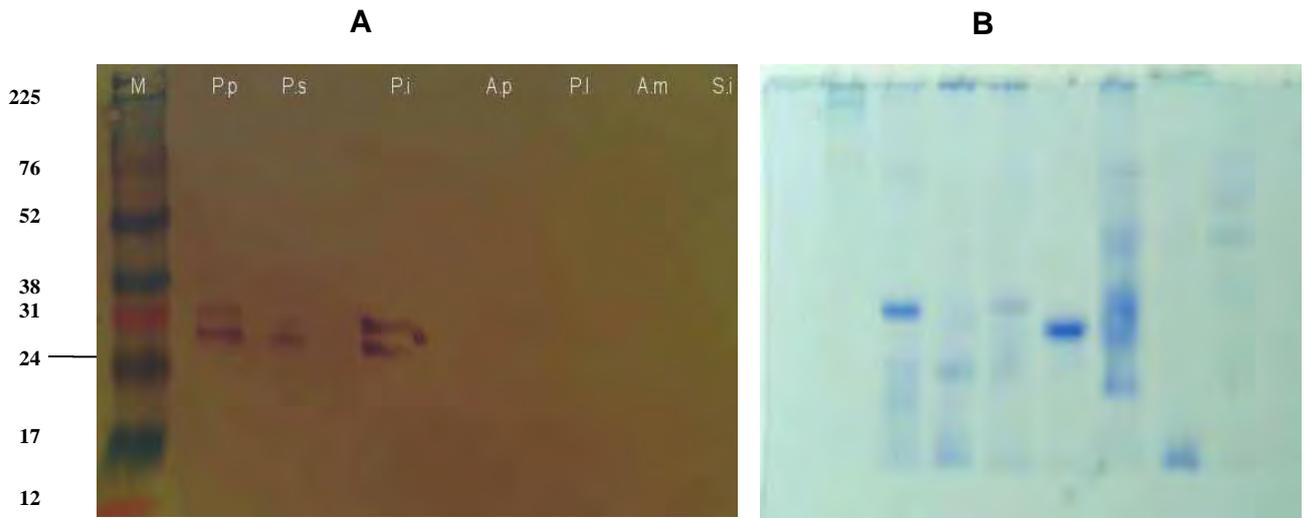


Figura 14 (A, B). Resultado de *Western Blotting* utilizando os anticorpos policlonais produzido em camundongos contra a fração eletroforética do veneno bruto de *P. paulista* (correspondente ao alérgeno Ag5), demonstrando a especificidade dos anticorpos e o nível de imunoreatividade cruzada com os extratos brutos de veneno de, 1- *P. sericea*, 2- *P. ignobilis*, 3- *A. pallipes pallipes*, 4- *P. lanio lanio*, 5- *A. mellifera* e 6- *S. invicta*. No gel de sistema desnaturante de poliacrilamida (10%) foram aplicadas 80µg de proteína de cada um destes extratos. Em **(A)** membrana após revelação com o sistema de fosfatase alcalina, **(B)** perfil proteico do gel após transferência.

Esses dados foram também quantificados por análise densitométrica da membrana por meio do Software Scion Image®, sendo que os níveis de intensidade das bandas obtidas foram respectivamente de: 10.748 e 8.000 u.a. (unidades arbitrárias) para as bandas de 25 e 30 kDa de *P. paulista*; 3.874 u.a. para a banda de 25 kDa do veneno *P. sericea* e 9.000 e 8.544 u.a. para as bandas de 25 e 30 kDa de *P. ignobilis*, respectivamente **(Figura 15)**.

Os valores densitométricos de maior intensidade foram encontrados nas isoformas de massa molecular 25 kDa, no veneno da vespa *P. paulista*, indicando alto nível de especificidade imunológica dos anticorpos produzidos. Quanto à reatividade cruzada, os maiores níveis foram observados para as bandas de 25 e 30 kDa no veneno de *P. ignobilis* e os menores níveis observados para a banda de 25 kDa de *P. sericea*.

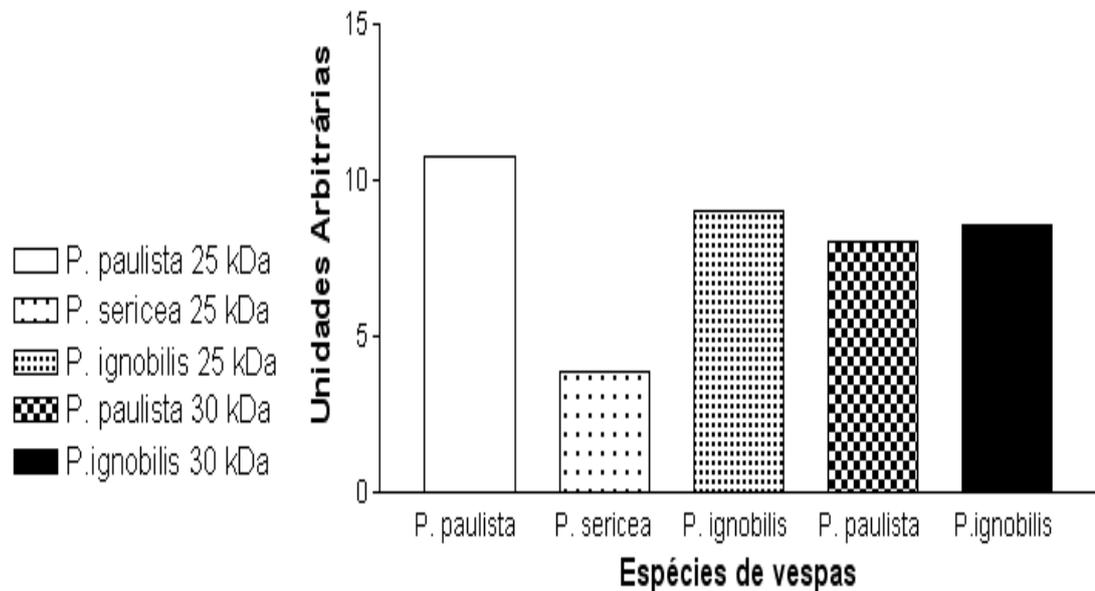


Figura 15. Gráfico comparativo da análise densitométrica da membrana de nitrocelulose após imunodeteção (Fig. 19) mostrando os diferentes níveis de intensidade das bandas marcadas. Conforme o esperado observa-se maior intensidade da reação específica do anticorpo anti-Ag5 de *P. paulista* contra o mesmo alérgeno do veneno desta vespa.

É interessante observar que sob estas condições experimentais foram observadas reações imunológicas cruzadas somente entre os alérgenos Antígeno 5 do veneno de vespas do mesmo gênero *Polybia*.

5.9 Modelagem e análise da estrutura tridimensional do alérgeno Ag5 do veneno da vespa social *P. paulista*

O modelo tridimensional do Ag5 de *P. paulista* foi construído com base na estrutura do Ag5 recombinante de *V. vulgaris* (Ves v 5) (código PDB 1QNX) determinada por cristalografia de raios X, resolvida a 1.9 Å. As duas sequências possuem 71% de similaridade nas regiões de estrutura secundária. Foram construídos 500 modelos e o de melhor “energia” foi escolhido e submetido à análise estereoquímica com emprego do programa Procheck (LASKOWSKI, MACARTHUR, THORNRON, 1993). A análise da topologia da molécula e a posição de seu possível sítio ativo estão apresentados na **Figura 16**, bem como a posição dos aminoácidos hidrofóbicos (internos) e hidrofílicos (externos). Nessa figura verifica-se a presença de

um sulco bastante aberto que não se configura como um sítio ativo em acordo com os relatos de ausência de atividade funcional dessa proteína.

A proteína Ag5 possui um dobramento (*fold*ing) do tipo sanduíche beta constituído por três fitas beta antiparalelas ligadas a sete alfa hélices e por *loops*, expostos ao solvente (**Figura 17**).

Em relação às diferenças observadas entre as estruturas de *P. paulista* e de *V. vulgaris*, a mais evidente se refere às quatro pontes dissulfeto existentes na proteína Ves v 5, conhecidas por estabilizar a molécula (Cys4-Cys17, Cys8-Cys101, Cys26-Cys94 e Cys170-Cys187). Essas ligações covalentes não ocorrem na proteína Ag5 de *P. paulista*, devido a importantes substituições de aminoácidos que podem ter ocorrido durante o processo evolutivo (Cys4-Arg16, Leu8-Cys104, Ser26-Cys96 e Arg172-His189), (**Figura 18 A, B**).

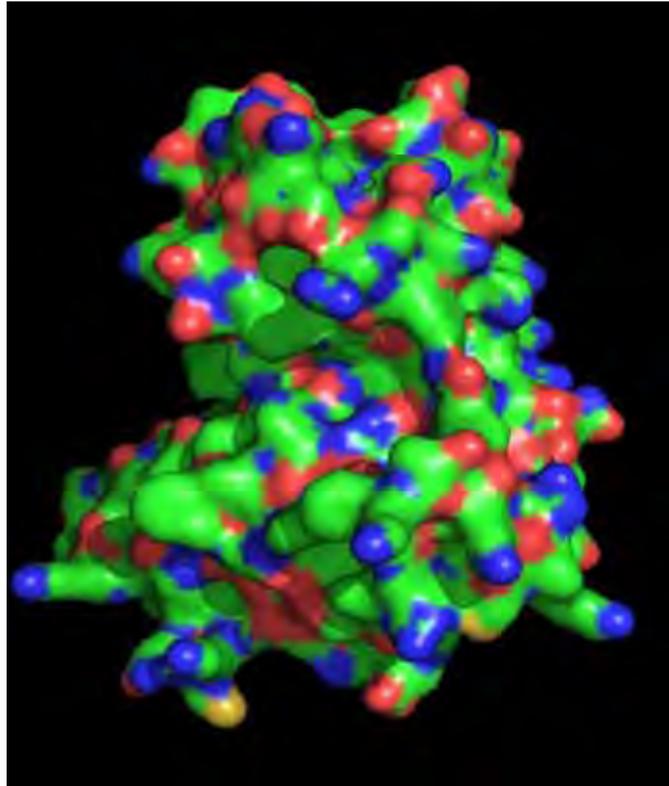


Figura 16. Modelo tridimensional mostrando a topologia da proteína Ag5 de *P. paulista*, no qual se observa a ausência de um sítio ativo formado. Este modelo foi construído com base na estrutura do Ag5 da *Vespula vulgaris*, através do programa Modeller V8.2 (SALI, BLUNDELL, 1993) e visualizado pelo programa PyMol (DELANO, 1993). As regiões em verde correspondem ao grupo de aminoácidos hidrofóbicos, em azul aminoácidos que contêm nitrogênio (histidina, arginina, asparagina e triptofano), em vermelho: aminoácidos que contêm o grupo oxigênio (treonina, aspartato), em amarelo os grupos enxofre (sulfidril), como cisteína e metionina.

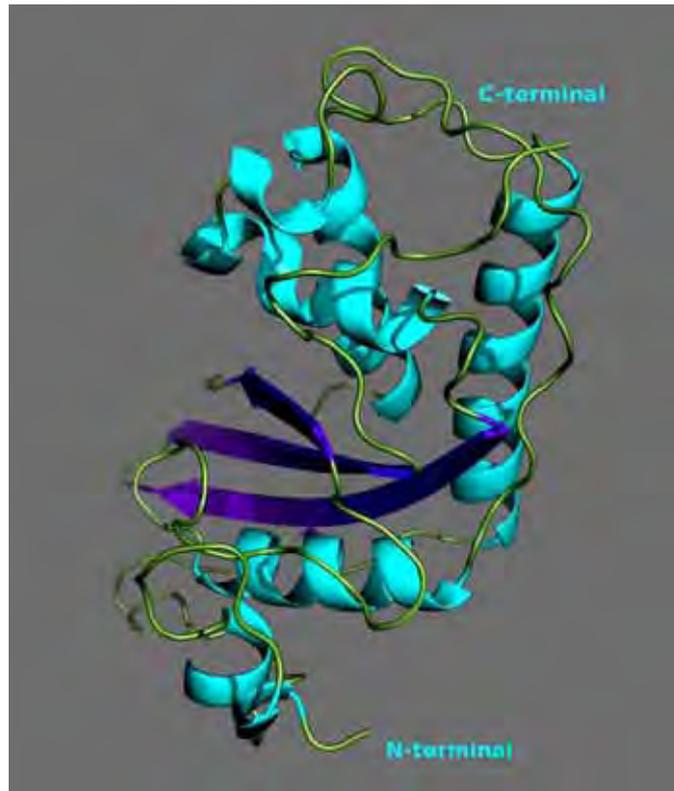


Figura 17. Modelo tridimensional do alérgeno Ag 5 da vespa social *P. paulista*, mostrando os elementos de estrutura secundária. A molécula é do tipo “sanduiche” beta contendo três fitas betas antiparalelas ligadas a sete alfa hélices e por *loops* extensos.

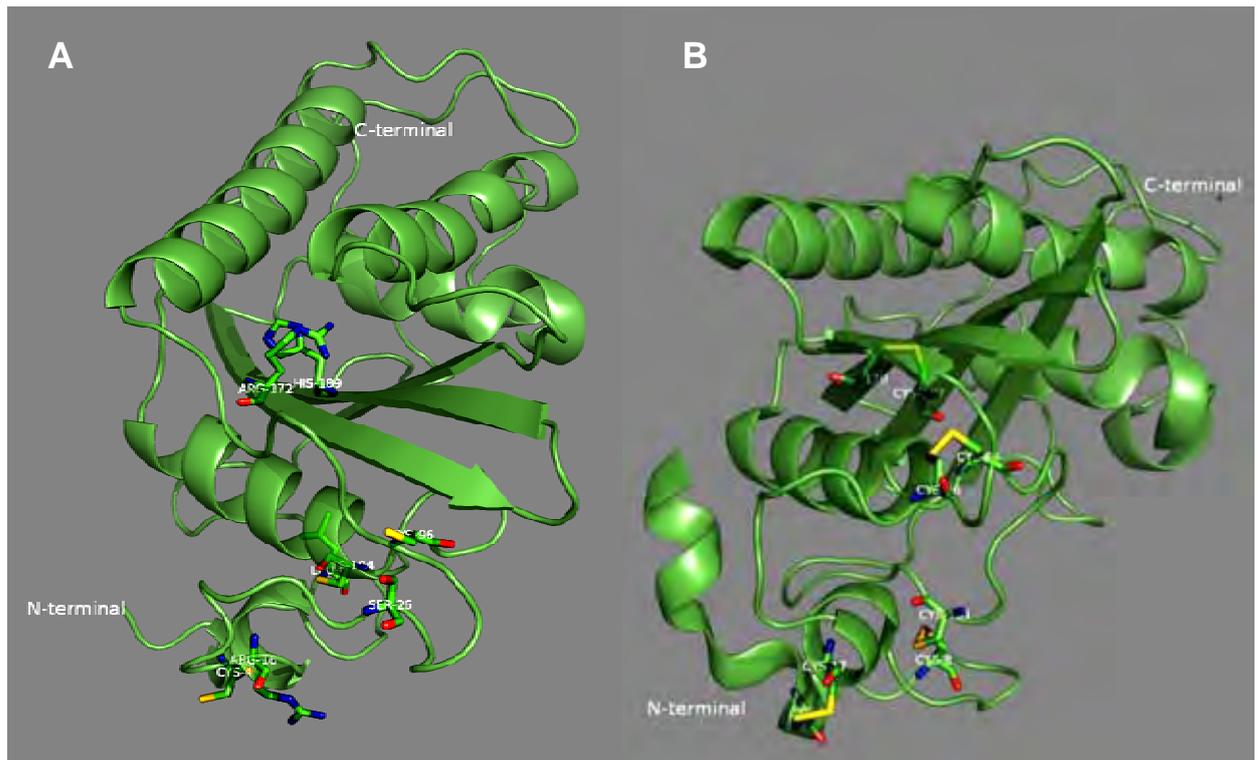


Figura 18. Comparação entre o modelo estrutural **(A)** Ag5 de *P. paulista* e **(B)** a estrutura tridimensional obtida por cristalografia de Ves v 5 mostrando as quatro pontes dissulfeto existentes nessa última, e ausência das mesmas em *P. paulista*.

5.9.1 Análise das regiões potencialmente imunogênicas (epítomos) encontradas no modelo estrutural de Ag5 de *P. paulista*

O modelo estrutural foi submetido à análise de Hoop, Woods (1981) que verifica o índice de hidrofiliidade de uma proteína o qual, está diretamente relacionado ao potencial antigênico da molécula, ou seja, quanto maior o número de regiões hidrofílicas na superfície maior será o potencial de antigenicidade. Devido à perda das pontes dissulfeto a estrutura da molécula apresenta-se mais aberta e conseqüentemente mais hidrofílica, o que implica em um maior potencial imunogênico, em relação às outras estruturas determinadas.

A sequêcia dessas regiões potencialmente imunogênicas foi identificada pelo servidor *Conformational Epitope Prediction Server* (KULKARNI-KALE, BHOSLE, KOLASKA, 2005) o qual revelou 9 resíduos de epítomos conformacionais na molécula, apresentados na **Tabela 4**. Segundo esse servidor os aminoácidos dispostos em letras minúsculas representam acessibilidade pelo anticorpo menor que 25%.

Para melhor visualização desses sítios no modelo estrutural foi feita a análise da molécula pelo programa Modeller (SALI, BLUNDELL, 1993) e editado pelo programa PyMol, pelo qual foi possível observar que a maior parte dos epítomos estão localizados nas regiões de *loops* externos (**Figura 19 A, B**).

Tabela 4: Regiões previstas como epítomos conformacionais na proteína Ag 5 de *P. paulista* em acordo com a análise realizada no servidor *Conformational Epitope Prediction Server* (KULKARNI-KALE, BHOSLE, KOLASKA, 2005). Os aminoácidos que estão em letra minúscula, apresentam acessibilidade pelo anticorpo menor que 25%.

1	1: NKnCVRKLAKFA :12
2	16: RLYGEsTKPSsKCNkVSITSVGvTEEEkKL :45
3	59: QGLeTRgNPGPqP :71
4	74: SDmNNIVWNDE :84
5	118: YSASTAAYPGiVS :130
6	144: YSQGiTKeNFSK :155
7	178: IQKL :181
9	204: NNT :206

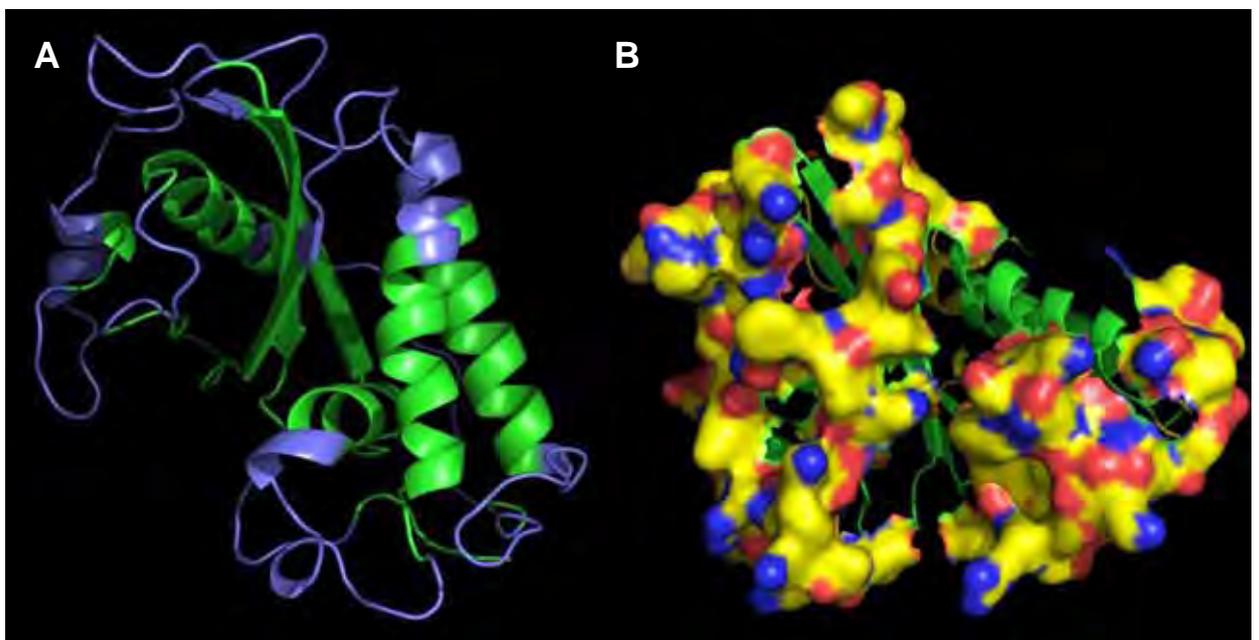


Figura 19. Modelos tridimensionais para o alérgeno Ag5 da vespa social *P. paulista*, mostrando as regiões imunogênicas visualizadas pelo programa Modeller (SALI, BLUNDELL, 1993) e PyMol (DELANO, 1993). Em (A) os epítomos conformacionais estão mostrados em lilás, em (B) mostra-se a topologia dos mesmos epítomos (azul, amarelo e vermelho, representam respectivamente os átomos de nitrogênio, carbonos e oxigênio presentes nos grupos laterais dos resíduos de aminoácidos).

A análise dos possíveis sítios de glicosilação na molécula também foi feita, utilizando-se o programa *Expasy* e revelou apenas um sítio de maior probabilidade de ocorrência no aminoácido Ser 21, portanto uma ligação do tipo O-ligado. Esse aminoácido faz parte da primeira região potencialmente imunogênica apresentada na **Tabela 4** e está descrito como de baixa acessibilidade pelo anticorpo. É interessante observar que se a glicosilação realmente ocorrer na Ser 21, o potencial imunogênico deste segundo fragmento deverá ser o mais elevado comparado aos demais.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O Ag5 é uma das proteínas mais importantes entre as encontradas nos venenos das vespas sociais, tendo sido descrito em 19 diferentes espécies destes insetos. Embora sua função biológica seja desconhecida, vários estudos têm demonstrado sua relevante ação alergênica (HOFFMAN, 1993, 2006).

A sequência primária de aminoácidos e os aspectos imunológicos deste alérgeno têm sido extensivamente estudados, por estar envolvido em importantes reações imunológicas cruzadas com o Ag5 do veneno de outros insetos sociais e com a família das proteínas ricas em resíduos de cisteína (CRISP) (PIRPIGNANI et al., 2002; PANTERA et al., 2003).

A proteína Ag5 de *P. paulista* foi determinada por tradução do cDNA completo (621 pb) obtido por RT-PCR e apresentou 207 aminoácidos, tal qual a proteína de *P. paulista* determinada por análises proteômicas (SANTOS, 2002) e a de *P. scutellaris* (PIRPIGNANI et al., 2002). De acordo com os dados obtidos, as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos demonstraram maior similaridade com o Ag5 da vespa *P. scutellaris*. Essa proximidade pode ter ocorrido por adaptação genética ao ambiente, já que, ambas estão localizadas na América do Sul, sendo a ocorrência principalmente da *P. scutellaris* na Argentina e no Uruguai. Embora o número de espécies comparadas tenha sido pequeno, verifica-se maior similaridade e menor distância filogenética entre as sequências de Ag5 provenientes do mesmo gênero, no caso *Polybia*.

De acordo com a hipótese de Lu et al. (1993) a ocorrência de reatividade cruzada do alérgeno Ag5 de diferentes espécies de vespas é diretamente proporcional ao grau de similaridade. Assim, a grande similaridade da sequência de Ag5 da espécie aqui estudada com a das demais espécies analisadas implica numa alta possibilidade de ocorrência de imunoreatividade cruzada entre os alérgenos Ag5 de seus venenos.

Santos (2007) determinou por estudos proteômicos 5 isoformas deste alérgeno, sendo que, na sequência traduzida e determinada neste estudo foram encontrados 42 resíduos de aminoácidos diferentes em relação à estas isoformas. Estes dados são relevantes e fortes indicativos da existência de uma sexta isoforma deste alérgeno na população de indivíduos de *P. paulista* estudados ou ainda de que estas diferenças

observadas ocorreram em função das diferentes metodologias utilizadas: análise proteômicas (SANTOS, 2007) e análise molecular neste trabalho. Além de se tratar de um polimorfismo genético natural, esta pode ser talvez também uma estratégia interessante para driblar o sistema imune do indivíduo.

A análise dos domínios conservados mostrou que a sequência aqui estudada assim como as de Ag5 de outras espécies de vespas faz parte da família de proteínas extracelulares “SCP-like”, encontradas em eucariotos. Esta família inclui importantes proteínas tais como:

a) A proteína P14-A (integrante do grupo das proteínas PRPs: “pathogenis related proteins”) encontrada em folhas de tabaco e no tomate e que apresenta atividade antifúngica contra o *Phytophthora infestans* (KING et al, 1990; LU et al., 1993; NIDERMAN et al., 1995). Os resultados de similaridade dos domínios demonstram também a existência de relação entre o sistema de defesa das plantas e o sistema imunológico do homem;

b) A GliPr em humanos a qual, tem seu gene altamente expresso em tumores de cérebro, glioblastoma multiforme/astrocitoma, tecidos de cérebro do adulto e nos tumores de outros nervos. Esta proteína também apresenta cerca de 50% de similaridade com as proteínas relacionadas a patogenias encontradas em plantas (MURPHY et al., 1995).

c) A proteína hipotética T05A10.5 de *Caenorhabditis elegans* (nemátoda);

d) As proteínas ricas em cisteína (CRISP) que levam esse nome devido à abundância de resíduos de cisteína (n=16) encontrados na região conservada entre os membros da família. A maioria do que se sabe sobre o mecanismo molecular das proteínas CRISP foi derivadas de estudos dos membros da toxina da família CRISP encontrados em várias cobras e lagartos e recentemente em mamíferos, como as de revestimento de espermatozóides de ratos (ROBERTS et al., 2007).

e) A proteína Helotermine, do veneno do lagarto mexicano (*Heloderma horridum horridum*) cuja função é bloquear reversivelmente o RyR, o qual é responsável pela liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático para as células musculares. Esta proteína também apresenta uma similaridade de 22% com o Ag5 de *V. vulgaris* (Ves v 5) em

uma região C-terminal rica em cisteína, encontrada também nas proteínas de mamíferos, mas ausente nas de insetos, plantas e fungos (HENRIKSEN et al., 2001).

Neste trabalho, os anticorpos policlonais produzidos em camundongos, contra a fração protéica de Ag5 de *P. paulista* foram testados através da técnica de *Western Blotting*. Desta forma, foi possível avaliar o grau de especificidade deste anticorpo devido ao forte reconhecimento da isoforma de 25 kDa no veneno de *P. paulista*, entre as proteínas eletrotransferidas para a membrana. Os anticorpos também reconheceram uma segunda banda ~30 kDa nos venenos do gênero *Polybia*, a qual pode tratar-se de uma isoforma comum a todos eles. Por outro lado, o mesmo apresentou diferentes níveis de reatividade cruzada com as frações protéicas de Ag5 e suas possíveis isoformas nos venenos de *P. sericea* e *P. ignobilis*, sendo mais elevado neste último. É interessante salientar que a reação imunológica cruzada foi detectada somente entre o Ag5 do veneno de vespas do mesmo gênero, e não foram observadas reações cruzadas com os extratos protéicos dos venenos de *S. invicta*, *A. pallipes pallipes*, *P. lanio lanio* e *A. mellifera*.

Estudos realizados com pacientes sensibilizados com o veneno da vespa *V. vulgaris* não demonstraram IgE relacionado à reatividade cruzada entre Ag5 desta vespa e *Sol i 3* (alérgeno similar ao Ag5 na espécie de formiga *S. invicta*), sendo este um resultado consistente com baixo grau de conservação da estrutura protéica e do comprimento dos *loops* neste alérgeno (HOFFMAN, 2006).

Portanto, nossos dados concordam com Padavattan et al. (2008), ressaltando que a reatividade imunológica cruzada entre os alérgenos Ag5 de vespas, seguem um padrão filogenético, de acordo com o grau de parentesco e o nível de homologia das sequências, desde que, quanto maior a similaridade maior o grau de reação cruzada.

Estudos sobre a topologia das proteínas são de extrema importância para compreender as interações entre antígeno-anticorpo, já que as ligações ocorrem nas superfícies (FALCÃO et al., 2002). Analisar as estruturas tridimensionais é, portanto essencial para o desenvolvimento de diagnósticos de alergia e imunoterapia em pacientes sensíveis ao veneno desses insetos sociais, bem como para a produção de novos fármacos.

O modelo estrutural do Ag5 de *P. paulista* mostra que as quatro pontes dissulfeto, encontradas nas outras estruturas já determinadas para este alérgeno, estão ausentes, devido a importantes substituições de aminoácidos (Arg16, Leu8, Ser26, Arg172 e His189) que podem ter ocorrido durante o processo evolutivo. A ausência dessas pontes tem implicações estruturais e imunológicas.

Estas substituições sugerem uma estrutura molecular flexível e hidrofílica em comparação com a Ves v 5 e demais proteínas relacionadas, que são mais rígidas e hidrofóbicas devido à presença das pontes dissulfeto. Além disso, também tornam a molécula mais básica do que a de Ves v 5, uma vez que o ponto isoelétrico (PI) encontrado para Ag5 de *P. paulista* foi de 9,65 contra 9,02 para Ag5 de Ves v 5 (HENRIKSEN et al., 2001).

A maior flexibilidade da molécula de Ag5 de *P. paulista* em virtude da substituição de aminoácidos nas regiões de pontes dissulfeto, também implica em uma maior susceptibilidade de interação com os anticorpos. Além disso, os aminoácidos substituídos em *P. paulista* são frequentemente encontrados na constituição de epítomos, sendo a histidina o mais imunogênico deles, segundo a escala de Westwood (2001): His > Lys > Ala > Leu > Asp > Arg. Em relação à composição de aminoácidos, o Ag5 de *P. paulista* apresenta 2,91 % de histidina em relação aos 2,64% encontrado em Ves v 5.

Todos esses dados são inéditos e contribuem para estudos de caracterização dos alérgenos de venenos de insetos. No entanto, é importante que sejam validados por estudos de cristalização e dosagem de IgE específico a este alérgeno, para que possam trazer mais informações a respeito do potencial imunogênico da proteína em questão.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- ✓ A sequência completa de cDNA do Ag5 do veneno de *P. paulista*, apresenta 621 pb, sendo que a região aberta de leitura se encontra entre as bases 226 a 620. A proteína traduzida, que possui 207 aminoácidos com massa molecular de 23370.47 Daltons, mostrou-se altamente conservada em comparação ao mesmo alérgeno das vespas analisadas. A mesma faz parte da família das proteínas extracelulares “SCP-like”, encontradas em eucariotos, como as proteínas ricas em cisteína (CRISP) e P14-A encontradas em tomate.
- ✓ Devido ao elevado nível de conservação e similaridade foi possível observar a ocorrência de imunoreatividade cruzada somente entre os alérgenos de Ag5 do veneno de vespas do mesmo gênero, *Polybia*, embora não se descarte a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com venenos de outros insetos sociais não testados neste estudo.
- ✓ A partir dos resultados da análise imunológica, de ocorrência de elevados níveis de imunoreatividade cruzada entre os alérgenos Ag5 dos venenos de *P. paulista* e *P. ignobilis*, podemos inferir que pacientes alérgicos a este componente no veneno de *P. paulista* poderiam receber tratamento imunoterápico com o anticorpo anti-Ag5 do veneno de *P. ignobilis* e vice-versa, enquanto que a mesma eficiência não seria obtida com a utilização do componente de *P. sericea*.
- ✓ Ag5 de *P. paulista* apresenta uma estrutura molecular flexível e potencialmente mais imunogênica do que o mesmo alérgeno de Ves v5, devido à ausência das pontes dissulfeto.
- ✓ Os resultados aqui obtidos contribuem com a eficácia da imunoterapia em pacientes alérgicos, disponibilizando maiores informações sobre a imunoreatividade cruzada, tendo-se em vista que ainda não existem no Brasil metodologias e testes diagnósticos específicos desenvolvidos para o tratamento de alergia aos venenos de nossos insetos neotropicais.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M. D. M. **Estudo estrutural por RMN do peptídeo Policatiônico Polybine I de veneno da vespa *Polybia paulista***. 2006. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Exatas do Câmpus de São José do Rio Preto-SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- ANTONICELLI, L.; BILO, M.B.; BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. **Curr. Opin. Allergy Immunol**, London, v. 2, p. 341-346, 2002.
- BANKS, B.E.C.; SHIPOLINI, R.A. Chemistry and pharmacology of Honey-Bee venom. In; **Venoms of the Hymenoptera-Biochemical, pharmacological and behavioral aspects**. Ed: Piek, T. London, p. 330-416, 1986.
- BILÓ, B.M; RUEFF, F.; MOSBECH, H.; BONIFAZI, F.; OUDE-ELBERINK, J.N.G, et al. **Diagnosis of Hymenoptera venom allergy**, p.1339-1349, 2005.
- 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**, Copenhagen, v. 118, p. 309-10, 1999.
- BROCHETTO, M.B. Operária *Polybia paulista*. UNESP, Rio Claro, 5 abr. 2008. 1 fotografia color.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, Jr. V. Animais peçonhentos no Brasil. **Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 468, 2003.
- CARPENTER, J. M.; MARQUES, O. M. **Contribuição ao Estudo dos Vespídeos do Brasil**. Série Publicações Digitais, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Bahia, 3, CD-ROM. 2001.
- CASTRO, C.M; PALMA, M.S. **Alergia a venenos de insetos**. Phadia, Brasil, p. 231, 2009.

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

DIDIER, G.E.; MARGO, M.H.; WIM, J.E. **Hymenoptera venom allergy**. Expert Review of Clinical Immunology, London, V.1, p.169-175, 2005.

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.

FALCÃO, P.K.; NETO, J.L.S.; FERNANDES, J.H; HIGA, R.H.; BAUDET, C.; NESCHICH, G. Primeiro Curso STING Millennium Suite Chemogenomics: Ferramentas para Analisar Macromoleculares e Aplicações em Chemogenomics, **Documentos/Embrapa Informática Agropecuária**, Campinas, v.1, p. 26, 2002.

GRANSTRON, D.E.; REED, S.M. Equine protozoal myeloencephalitis. **Equine Pract**, v.16, p.23-26, 1994.

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. ed. Boca Raton, Fla: CRC Press, v. 4, 2003.

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.

HABERMANN, E.; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, German, v. 50, p. 163, 1972.

HAMES, B.D; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**, 2 ed IRL.Press, Oxford, p. 200, 1990.

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.

HEMMER, W. Cross-reactivity to honeybee and wasp venom. **Hautarzt**, German, v. 59, n. 3, p.194-199, 2008.

HENRIKSEN, A.; KING, T.P.; MIRZA, O.; MONSALVE, R.I.; MENO, K.; IPSEN, H.; LARSEN, J.N.; GAJHEDE, M.; SPANGFORT, M.D. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: Structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 45, p. 438-448, 2001.

HOFFMAN, DR. Allergens in Hymenoptera venom XXIV: the amino acid sequences of imported fire ant venom allergens Sol I II, Sol I III, and Sol I IV. **J. Allergy Clin. Immunol**, Saint Louis, v. 91, n.1, p.71-78, 1993.

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

HOFFMAN, DR. Hymenoptera Venom Allergens. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, Baltimore, v.30, p. 109-128, 2006.

HOLLOBLER, B.; WILSON, E.O. The number of queens: an important trait in ant evolution. **Naturwissenschaftler**, v.64, p. 8-15, 1977.

HOOP, T.P.; WOODS, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v.78, p. 3824, 1981.

JACOMINI, M.B. Ninho de *Polybia paulista*. UNESP, Rio Claro, 10 jun. 2009. 1 fotografia color.

JOHANSSON, S.G.O.; HOURIHANE, J.; BOUSQUET, J. A revised nomenclature for allergy. **Allergy**, Copenhagen, v.51, p.216-225, 2001.

KING, T.P.; SOBOTKA, A.K.; ALAGON, A.; KOCHORIMIAN, L.; LICHTENSTEIN, L.M. Protein allergens of white-faced hornet, yellow jacket venoms. **Biochemistry**, New York, v.17, p.5165-5177, 1978.

KING, T.P.; MORAN, D.; WANG, D.F.; KOCHOUMIAN, L. CHAIT, B.T. Structural studies of a hornet venom allergen antigen 5, Dol m V and its sequence similarity with other proteins. **Protein Seq. Data. Anal.**, New York, v.3, n.3, p. 263-266, 1990.

KING, T.P.; LU, G.; GONZALEZ, M.; QIAN, N.; SOLDATOVA, L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.98, p. 588-600, 1996.

KING, T.P., SPANGFORT, M.D. Structure and biology of stinging insect venom allergens, **Int. Arch. Allergy Immunol**, Copenhagen, v.123, p. 99–106, 2000.

KISCHNICK, S.; et al. Bacterial fermentation of recombinant major wasp allergen Antigen 5 using oxygen limiting growth conditions improves yield and quality of inclusion bodies. **Protein Expression and purification**, v. 47, p. 621-628, 2006.

KULKARNI-KALE, U.; BHOSLE, S.; KOLASKAR, A.S. CEP: a conformational epitope prediction server. **Nucleic Acids Research**, Índia, v. 33, p. 168-171, 2005.

LANGLEY, R. L.; MORROW, W. E. Deaths resulting from animal attacks in the United States. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 8, n. 1, p. 8-16, 1997.

LANGLEY, R. L. Animal-related fatalities in the United States an update. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 16, n. 2, p. 67-74, 2005.

LASKOWSKI R.A, MACARTHUR M.W, Moss D.S, THORNTON J.M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. App. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.

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

LU, G.; VILLALBA, M.; COSCIA, M.R.; HOFFMAN, D.R.; KING, T.P. Sequence Analysis and Antigenic Cross-reactivity of a Venom Allergen, Antigen 5, from Hornets, Wasps and Yellow Jackets. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 2823-2830, 1993.

MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. 2ª ed. - Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, p. 120, 2001.

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.

MARKOVIĆ-HOUSLEY, Z., MIGLIERINI, G., SOLDATOVA, L., RIZKALLAH, P. J., MÜLLER, U., SCHIRMER, T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. **Structure**, Philadelphia, v. 8, p. 1025-1035, 2000.

MENDES, M.A; DE SOUZA, B.M.; SANTOS, L.D.; SANTOS, K.S.; PALMA, M.S. Analyzing glycerol-mediated protein oligomerization by electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, Chichester, v.19, n. 18, p. 2636-2642, 2005.

MILNE, T. J., ABBENANTE, G., TYNDALL, J. D. A., HALLIDAY, J. AND LEWIS, R. J. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31105-31110, 2003.

MONSALVE, R; LU, G; KING, T.P. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. **Protein expression and purification**, v.16, p. 410-416, 1999.

MÜLLER, U. R. Recombinant Hymenoptera venom allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n.7, p. 570-576, 2002.

MÜLLER, L.; et. al. Sensitization to wasp venom does not induce autoantibodies leading to infertility. **Molecular immunology**, Elmsford, v. 45, p. 3775-3785, 2008.

MÜLLER, U. R. Insect venoms. **Allergens and Elicitors**, v. 95, p. 143-158, 2010.

MURPHY, E.V.; ZHANG, Y.; ZHU, W.; BIGGS, J. The human glioma pathogenesis-related protein is structurally related to plant pathogenesis-related proteins and its gene is expressed specifically in brain tumors. **Gene**, v. 159, n. 1, p. 131-135, 1995.

NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, T.; FUKUDA, K.; TSUKAMOTO, Y. Wasp kinins, new cytotrophic peptide families and their physicochemical properties. **Peptides**, v. 6, p. 425-430, 1985.

NELSON, P. N., REYNOLDS, G. M., et al. Monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Pathology**, v. 53, p. 111-117, 2000.

NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYERE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MOSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiol**, v. 108, n.1, p. 17-27, 1995.

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

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.P., SCHEIRDT, A.C. Patogênese da mionecrose em preparações de diafragmade camundongo induzida pelo veneno bruto da vespa social *Polybia paulista*. **UEPG Biol. Health Sci.**, Ponta Grossa, v. 11, n. 1, p. 47-54, 2005.

PADAVATTAN, S., SCHIRMER, T., SCHMIDT, M., AKDIS, C., VALENTA, R., MITTERMANN, I., SOLDATOVA, L. et al. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 368, n. 3, p. 742–752, 2007.

PADAVATTAN, S.; SCHMIDT, M.; HOFFMAN, DR.; MARKOVIĆ-HOUSLEY, D. Crystal Structure of the Major Allergen from Fire Ant Venom, Sol i 3. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 383 , p.178-185, 2008.

PALMA, M.S. Insect venom peptides. In: KASTIN, A.J. **Handbook of biologically active peptides**. 1 edição, Academic Press, Oxford, p. 389-396, 2006.

PANTERA B.; HOFFMAN, D.R.; CARRESI, L.; CAPPUGI, G; TURILLAZZI, S.; MANAO, G.; SEVERINO, M.; SPADOLINI, I.; ORSOMANDO, G.; MONETI, G.; PAZZAGLI, L. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam v. 162, n. 2-3, p. 72-81, 2003.

PIEK, T.; BUITENHUIS, A.; SIMONTHOMAS, R.R.T.; UFKES, J.G.R.; MANTEL, P. Smooth muscle contracting compounds in the venom of *Megascolia flavifrons* (Hymenoptera – Scoliidæ) with notes on the stinging behaviour. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 75, p. 145-152, 1983.

PIEK, T. Pharmacology of hymenoptera venoms. In: Tu, A. (Ed), **Handbook of Natural Toxins, Insect Poisons, Allergens and Other Invertebrate Venoms**, Marceel Dekker, New York, v.2, p. 135-185, 1984.

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.

PIEK, T. A toxinological argument in favor of the close relationship of the Vespidae in the Scoliidæ (Hymenoptera). **Ent. Ber. Amst.**, v. 47, p. 96-98, 1987.

PIRPIGNANI, M.; RIVERA, E.; HELMAN, U.; BISCOGLIO, M.; BONINO, J. Structural and Immunological Aspects of *Polybia scutellaris* Antigen 5. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 407, p. 224-230, 2002.

PRZYBILLA, B.; RUËFF, F. Hymenoptera venom allergy. **Journal of the German, Munich, German**, v. 8, p. 114-129, 2010.

RADIN, N. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. **Biochem J.** v.371, n. 2, p. 243-56.2003.

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.

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

ROBERTS KP, JOHNSTON DS, NOLAN MA, WOOTERS JL, WAXMONSKY NC, PIEHL LB, ENSRUD-BOWLIN KM, HAMILTON DW. Structure and function of epididymal protein cysteine-richsecretory protein-1. **Asian J Androl**, v. 9, n. 4, p. 508-514, 2007.

ROSS, R.N.; NELSON, H.S.; FINEGOLS, I. Effectiveness of specificimmunotherapy in the treatment of hymenoptera venom hypersensitivity: ameta-analysis. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v.22, p. 351-358, 2000.

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**. Cold Spring Harbor, New York, p. 253, 1989.

SANTOS, L. D. **Análise proteômica dos alérgenos imunodominantes do veneno da vespa *Polybia paulista***. 2007. 197f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro-SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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

SCARRATT, K.W.; WALLACE, A.M. Diagnosis and management of equine protozoal myeloencephalitis and concurrent infectious disease in two horses. **Equine Pract**, v.20, p.23-25, 1998.

SEDMAK, J. J., GROSSBERG, S. E. A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 79, p.544-552, 1977.

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.

SCOTT, D. L., OTWINOWSKI, Z., GELB, M. H., SIGLER, P. B. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science**, Washington, v. 250, n. 4987, p. 1563–1566, 1990.

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.

SKOV, L.K., SEPPALA, U., COEN, J.J.F., CRICKMORE. N., KING, T.P., MONSALVE R., KASTRUP, J.S., SPANGFORTB M.D., GAJHEDE, M. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0Å resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. **Acta Cryst. D**, v. 62, p. 595–604, 2006.

SOUZA, B., M. Peptídeos policatiônicas do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera, Polistinae): estrutura e função. Rio Claro, p. 120, 2002.

SOUZA, B.M.; MENDES, M.A.; SANTOS, L.D.; MARQUES,M.R.; CÉSAR,L.M.M; ALMEIDA, R.N.A.; PAGNOCCA, F.C.; KONNO, K.; PALMA, M.S.Structural and Functional Characterization of Two Novel Peptide ToxinsIsolated from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, NewYork, v. 26, p. 2157-2164, 2005.

STEEN, C.J.; JANNIGER, C.K.; SCHUTZER, S.E.; SHUWARTZ, R.A. Insectsting reactions to bees, wasps and ants. **Int. J. Dermatol**, Philadelphia, v. 44, p. 01-94, 2005.

TERWILLIGER, T. C., EISENBERG, D. The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. **Journal of biological chemistry**,Bethesda, v. 257, n. 11, p. 6016–6022, 1982.

TOMÉ, S.; REIS, G.; REIS, G.; GUEDES, M.; SARAIVA, L.S; TEXEIRA.F. Imunoterapia com veneno de himenopteros: a experiência de uma consulta. **Acta Pediátrica Portuguesa**, Brasil, v. 40, n.1, p. 30-36, 2009.

VERMELHO A.B.; NOGUEIRA DE MELO.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L. d'Avila-Levy, C.M.; Couri, S.; Bon.P.S. Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. Em *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações E Mercado* 2008.

VÍZON, S.E.; et. al. Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a hypoallergenic antigen 5. **Protein Expression and Purification**, v. 73, p. 23-30, 2010.

VOVOLIS, V.; MIKOS, N.; KOUTSOSTATHIS, N. Successful venom immunotherapy to paper wasp, in IgE-venom negative patient. **Allergologia et Immunopathologia**. Espanha, p. 1016, 2010.

XIA, X., XIE. Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371-373, 2001.

WESTWOOD, O. M. R.; HAY, F. C. **Epitope Mapping – Practical Approach. An introduction to epitope mapping**. Oxford University Press, New York, 2001.

Sites consultados:

<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>

<http://ca.expasy.org/tools/>

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>

<http://www.pdb.org/pdb/>

<http://ca.expasy.org/prosite>

<http://curie.utmb.edu/episearch.html>

