
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATHALIA BAPTISTA DIAS

ANÁLISE PROTEÔMICA DO VENENO DA VESPA SOCIAL
***Polistes lanio lanio* (HYMENOPTERA; VESPIDAE)**



Rio Claro
2009

NATHALIA BAPTISTA DIAS

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO VENENO DA VESPA SOCIAL *Polistes
lanio lanio* (HYMENOPTERA; VESPIDAE)**

Orientador: Prof. Dr. Mário Sergio Palma

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel e Licenciado em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2009

595.798 Dias, Nathalia Baptista
D541a Análise proteômica do veneno da vespa social *Polistes*
lanio lanio Hymenoptera; Vespidae) / Nathalia Baptista Dias. -
Rio Claro : [s.n.], 2009
65 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e
Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Vespa. 2. Proteoma. 3. Arginina Quinase. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

O conhecimento me move e agradeço a tudo e a todos que me fizeram crescer e evoluir durante estes cinco anos de graduação.

Ao meu orientador **Prof. Mário Sérgio Palma**, o qual me fez crescer pessoalmente e profissionalmente durante esses quatro anos que passei no laboratório sob sua orientação, sempre com grande empenho, incentivo e sabedoria. Agradeço pelo trabalho que pude realizar e mais que tudo a amizade construída durante estes anos.

Aos professores e funcionários do Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS) e da UNESP pela amizade e ajuda sempre.

Aos amigos do LBEZ, **Bibi, Paulo, Lucy, Lorenzo (Dom), Beto, Analy, Vanessa, Nicoli e Daniel**, e àqueles que não estão mais no laboratório, **Keity, Maurício, Fernanda, Virginia, LÍlian, Alessandra, Luiz, Meire, Taty, LÍlian e Roberta**, pela ajuda e amizade em todos os momentos.

Ao **Andrigo**, pelo carinho, amizade, amor, confiança, e respeito durante este tempo que estamos juntos. Espero que esteja sempre por perto.

Aos meus amigos do **CBN 2005**, pela amizade e companheirismo nos 5 anos (intermináveis) de graduação, principalmente à **Vanessa, Priscila (Rose), Michele e Felipe (Closinho)**, meus grandes companheiros.

À minha grande amiga **Tê**, também à **Natalia e Maria Tereza** pela amizade de anos e anos.

Aos meus pais **Maria Aparecida e Ronaldo** pelo apoio, sempre estando ao meu lado nas horas mais difíceis e nas mais felizes, sendo minha base.

À minha irmã **Camila**, pelo companheirismo, amor, respeito e todos os momentos felizes, tristes, engraçados, que passamos juntas.

À toda a minha **família**, meu porto seguro sempre, principalmente aos meus tios, avós e primos que sempre estão ao meu redor me fazendo feliz e me apoiando.

À **Deus** por estar me dando forças para realizar meus sonhos.

Obrigada !!!!!

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO	5
2.1. Os insetos da Ordem Hymenoptera	6
2.2. O veneno de Hymenoptera	8
2.3. Alergia aos venenos de Himenopteros	11
2.4. Análise Proteômica	13
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Obtenção do veneno da vespa <i>Polistes lanio lanio</i>	18
4.2. Quantificação das proteínas	18
4.3. Eletroforese Bidimensional	18
4.4. Aquisição das Imagens	19
4.5. Eletrotransferência	19
4.6. Microsequenciamento por Química Degradativa de Edman	20
4.7. Microsequenciamento por Espectrometria de massas MS/MS	20
4.8. Identificação das Proteínas	22
4.9. Modelagem Molecular por Homologia	22
4.10. Avaliação do Modelo Estrutural	23
4.10.1 Procheck	23
4.10.2 Verify 3D	24
4.10.3 RMSD da geometria ideal	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. RESUMO:

Os venenos dos insetos da ordem Hymenoptera (abelhas, vespas e formigas) são responsáveis por um grande número de acidentes causados por ferroadas. Estes acidentes podem produzir uma série de reações, variando desde uma reação local, até uma reação sistêmica e anafilaxia. Estudos mostraram que 0,8% a 5% da população mundial sofrem de reações sistêmicas generalizadas após ferroadas de insetos pertencentes à ordem Hymenoptera.

As espécies pertencentes ao gênero *Polistes* são tipicamente encontradas no sudeste do Brasil, causando muitos acidentes por ferroadas devido principalmente à proximidade dos ninhos destes insetos das habitações humanas. *P. lanio lanio* é uma das vespas sociais que mais causam acidentes no Estado de São Paulo e pouco se sabe sobre a composição de seu veneno. As vespas do gênero *Polistes* são capazes de ferroar múltiplas vezes e causar reações alérgicas severas. Dessa forma, a identificação das proteínas mais abundantes do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* por uma abordagem proteômica, se faz necessária para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação desse veneno.

A identificação de várias proteínas do veneno de *P. l. lanio*, revelou importantes aspectos sobre o processo de envenenamento por vespas do gênero *Polistes*, os quais podem ajudar no melhor entendimento dos mecanismos de ação destes venenos. A compreensão dos principais alérgenos é uma etapa importante para o desenvolvimento de novos extratos específicos para diagnósticos de alergia e imunoterapia de pacientes sensíveis ao veneno de vespas.

2. INTRODUÇÃO:

2.1 Os insetos da ordem Hymenoptera.

A ordem Hymenoptera provavelmente originou-se há 300 milhões de anos, durante o final do paleozóico, que marcou o fim da era carbonífera. Durante a era mesozóica, que veio posteriormente e durou 239 milhões de anos, a ordem se diversificou até que, por volta do eoceno (cerca de 60 milhões de anos), surgiram os primeiros ancestrais das vespas sociais (BARRAVIEIRA, 1994).

Os himenópteros constituem a terceira ordem dos insetos em termos de número de espécies; porém, são os principais animais quando se pensa em biomassa no planeta. Cerca de 100 mil espécies de animais são conhecidas e incluídas nesta ordem (BETTINI, 1978). Hymenoptera é um dos grupos chaves na organização dos seres vivos. São os parasitas entomófagos e predadores predominantes nos ecossistemas terrestres, controlando as populações de diversos outros organismos (BRANDÃO, 1999). A ordem Hymenoptera se divide em duas subordens: Symphyta, onde predominam as espécies fitófagas e Apocrita onde a maioria das espécies é entomófaga. Nos Apocrita o primeiro segmento abdominal é fundido ao tórax e é chamado de propódeo; o segundo segmento é fortemente constricto e recebe o nome de pecíolo, que suporta o resto do abdômen. O ovipositor é modificado em uma estrutura capaz de provocar puncturas, usualmente utilizado na penetração de tecidos animais (BRANDÃO, 1999).

Os Hymenoptera Aculeata (com ferrão) mais primitivos são representados pelos *Scolioidea*, vespas escavadoras que parasitavam larvas de besouros e algumas espécies de vespas. As formas ancestrais dessas vespas provavelmente deram origem a três linhas evolutivas maiores de aculeatos que culminaram nas abelhas, vespas e formigas (BARRAVIEIRA, 1994).

O número de espécies conhecidas de Aculeata é de aproximadamente 50 mil, das quais 10 a 15 mil são formigas (superfamília *Formicoidea*), 10 mil são abelhas (superfamília *Apoidea*) e 20 a 25 mil são vespas (superfamílias *Bethyloidea*, *Scalioidea*, *Pompiloidea*, *Sphecoidea* e *Vespoidea*) (BARRAVIEIRA, 1994; DALY et

al. 1998). A maior parte é constituída de predadores ou consumidores de pólen e néctar. Em Aculeata considera-se em geral que espécies solitárias usam o ferrão para paralisar presas e que espécies sociais usam-no para defender a colônia (SILVEIRA, 1990). Entretanto, alguns Bethylidae, Pompilidae e Mutillidae são capazes de aplicar ferroadas bastante doloridas (RATHMAYER, 1978) enquanto por outro lado, algumas formigas da subfamília Ponerinae podem usar o ferrão na captura de presas (HERMANN; BLUM, 1981).

Entre os insetos, o aparelho de ferroar dos himenópteros fornece um meio de penetração através do tegumento dos vertebrados, injetando assim uma potente mistura de compostos tóxicos e causadores de dor. Estes compostos diminuem o potencial do predador, permitindo ao inseto escapar ou espantar o predador para longe. Segundo Starr (1985, 1989), o desenvolvimento do ferrão ocorreu devido a pressão exercida por predadores vertebrados, que foram atraídos pelo aumento de tamanho das colônias, principalmente nas regiões tropicais. Assim, a pressão predatória dos vertebrados, segundo este autor, teria favorecido o desenvolvimento do ferrão em Hymenoptera sociais, contribuindo para a evolução da eusocialidade. Já para Kukut et al. (1989), o desenvolvimento do ferrão teria sido mais favorecido pela pressão predatória de formigas, que aquela exercida pelos vertebrados.

Segundo Schmidt (1990), os ferrões da maioria dos Hymenoptera Aculeata são incapazes de penetrar no integumento esclerotizado de predadores Artropoda, limitando as possibilidades das ferroadas à áreas intersegmentais formadas de tecidos macios, de difícil acesso. Os predadores vertebrados geralmente possuem a pele recoberta de penas ou finos pelos, que funcionam como proteção, mas são susceptíveis ao ataque por himenópteros nas regiões em torno dos olhos, nariz, boca e orelhas, tornando assim os predadores vertebrados vulneráveis à penetração do ferrão. Assim, SCHMIDT (1990), considera o uso do ferrão uma tática “anti-vertebrados” muito poderosa, o que estaria de acordo com a proposição de STARR (1985, 1989).

Várias espécies de Hymenoptera sociais apresentam autotomia do aparelho de ferrão como parte do mecanismo de defesa de sua colônia (HERMANN, 1971). A vantagem deste processo está no fato de que o aparelho de ferrão uma vez automatizado e deixado na pele da vítima, continua a injetar veneno numa dosagem maior que aquela que poderia ser injetada, caso o ferrão fosse retirado da ferida, aumentando a eficácia da ação defensiva (SNODGRASS, 1956; HERMANN, 1971).

A autotomia é característica de algumas espécies de *Polybiinae* e a ausência deste fator é característico em espécies de *Polybiinae* e *Polistes* (BARRAVIEIRA, 1994).

Uma questão interessante para discussão é a presença ou ausência de farpas no ferrão. Segundo Hermann (1971), a aquisição de farpas nas lancetas representa um caso de evolução convergente em abelhas, vespas e formigas. Manzoli-Palma (1993) através da comparação do aparato de ferrão de diversas espécies de vespas, apresentou resultados mostrando que, de maneira geral as espécies que apresentam menor número de farpas por lanceta, são aquelas que não realizam autotomia do aparelho de ferrão. Ainda de acordo com as observações de Manzoli-Palma (1993), farpas pontiagudas foram encontradas na maioria das espécies que apresentam autotomia do aparelho de ferrão, enquanto que as farpas serreadas foram observadas somente em espécies que não apresentam tal processo. Neste trabalho foi observado o fato de que a maioria das espécies que apresentam autotomia do aparelho de ferrão são agressivas e geralmente atacam o alvo em grupos que se alternam rapidamente, o que geralmente provoca a perda de alguns indivíduos.

As vespas pertencentes ao grupo dos Hymenoptera Aculeata (com ferrão) estão divididas em três grandes superfamílias: Bethyloidea, Sphecoidea e Vespoidea (BROTHERS, 1975). A família Vespidae é uma subdivisão da superfamília Vespoidea, e apresenta a totalidade dos casos conhecidos de eusociabilidade em vespas, com mais de 800 espécies eusociais, as quais habitam colônias fundadas por apenas uma rainha e predam larvas de Lepidoptera, besouros e outras presas (AKRE, 1982). Essa família de vespas é composta por três subfamílias, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, onde a subfamília Polistinae é a única encontrada no Brasil, sendo representada por três tribos: Polistini, Epiponini e Mischocyttarini (CHAUD-NETTO et al., 1994).

Polistes lanio lanio é uma das vespas sociais que mais causam acidentes no Estado de São Paulo e pouco se sabe sobre a composição de seu veneno. Popularmente, ela é chamada de “marimbondo” ou “vespa cavalo”, construindo seus ninhos em lajes de casas ou em galhos de árvores, o que a coloca em contato muito próximo com o homem, corroborando com os altos índices de acidentes por ferroadas devido à sua proximidade com ambientes urbanos.

2.2 O veneno de Hymenoptera.

A glândula de veneno dos Aculeata pode apresentar variações, mas geralmente é constituída por dois filamentos excretores, um reservatório de veneno e um canal que liga o reservatório ao ferrão. A glândula de veneno, como todas as outras glândulas exócrinas das abelhas, é de origem ectodérmica e resulta da diferenciação dos discos imaginais genitais das fêmeas durante a pupação (NOCELLI, 2002).

A habilidade do veneno em produzir danos ou prejuízos aos tecidos é de grande valor defensivo para os insetos. Os venenos lhes conferem a habilidade de explorar novos habitats, com possibilidades de defesa contra os vertebrados predadores. Os venenos de Hymenoptera sociais têm sua utilidade defensiva, primariamente por sua propriedade de provocar dor, dano aos tecidos e letalidade, e como valor defensivo secundário inclui seu freqüente valor repelente para outros insetos e habilidade para induzir alergia nos mamíferos (SCHIMIDT, 1990).

Os venenos melhor caracterizados são de aculeatos eusociais (abelhas) e ectoparasitos idiobiontes, estes últimos utilizam-se de múltiplos hospedeiros (Vespoidea e Apoidea). Embora espécies sociais utilizem os venenos como defesa, análises comparativas sugerem que seus venenos são qualitativamente semelhantes àqueles produzidos por espécies parasitas. Todos produzem misturas de amins biogênicas (histamina e dopamina), peptídeos (melitinas, mastoparanos, e bradisininas), enzimas (fosfolipase, hyaluronidases, e serino proteases), e toxinas parálíticas (filantotoxinas e pompilidotoxinas) (DE LIMA; BROCHETTO-BRAGA, 2003; PARK, 2006; PIEK, 1990; SCHUMACHER; EGEN, 1995; WINSTON, 1994);

As principais amins biogênicas presentes no veneno de himenópteros são a histamina, a serotonina, a dopamina e a epinefrina, sendo que as duas primeiras estão relacionadas aos processos que levam à indução da dor. A histamina produz dilatação e aumenta a permeabilidade dos capilares sanguíneos sendo que, em concentrações elevadas, pode causar colapso vascular (SMITH et al., 1985). Acredita-se que a serotonina, bem como a histamina, também seja um agente difusor do veneno (DOTIMAS E HIDER, 1987).

Os peptídeos biologicamente ativos e proteínas são os principais responsáveis pelas dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas (LORENZI, 2002). Três tipos de peptídeos bioativos provenientes de venenos de várias espécies de vespas têm sido isolados e caracterizados (HO et al, 1998). Dentre eles, destacam-se os mastoparanos, peptídeos quimiotáticos e

cininas. A silverina faz parte do quarto grupo de peptídeos policatiônicos anfipáticos provenientes do veneno de vespas, sendo que recentemente foi descrita uma quinta família de peptídeos em venenos de vespas sociais, os quais são semelhantes às taquicininas, envolvidas na produção de inflamação neurogênica (YSHII et al, 2008). Os peptídeos encontrados nestes venenos geralmente são anfipáticos, policatiônicos e apresentam uma série de ações farmacológicas, as quais contribuem para a ocorrência de intensos processos inflamatórios (PALMA, 2006). O veneno de abelhas é muito rico em peptídeos, tais como: melitina, apamina, peptídeo desgranulador de mastócitos (MCD – “Mast Cell Degranulation”) e o “cardiopep” (HARVES, 1975).

Entre as principais proteínas caracterizadas estão o Antígeno-5, Fosfolipases, Hialuronidase (KING et al., 1996) e proteínas do tipo Serino-proteases (McNAIRY et al., 2000). Até o momento, todas essas proteínas foram caracterizadas como alérgenos capazes de sensibilizar, ou seja, induzir o sistema imune a produzir anticorpos com grande especificidade.

Estudo realizado com o veneno bruto da vespa social *P. paulista* evidenciou que o mesmo apresenta atividade de fosfolipase A2 (PbTx) dependente de cálcio. Apresenta elevado potencial hemolítico em “células vermelhas lavadas” de ratos Wistar, sendo esta atividade algumas dezenas de vezes mais elevada que aquelas causadas pelas fosfolipases A2 de *Apis mellifera*, *Naja nigricollis*, *Naja naja atra*, e da toxina letal da *Vespa basalis* (Oliveira; Palma, 1998).

Estudos farmacológicos com a fosfolipase A1, isolada do veneno da *Vespa basalis*, evidenciaram que a mesma induz a formação de edema, de forma muito mais potente quando comparada com as cardiotoxinas e fosfolipases A2 indutoras de edema, presentes nos venenos de serpentes (Ho et al., 1993).

A Hialuronidase é responsável por catalisar a hidrólise do ácido hialurônico, o qual é um dos constituintes da matriz celular. A presença de hialuronidase no veneno promove a difusão dos demais componentes do veneno através da viscosa matriz celular, facilitando o contato das toxinas com a membrana plasmática das células-alvo. As hialuronidasas presentes nos venenos de vespas são semelhantes às encontradas nos venenos de abelhas (LU et al., 1995), pois são moléculas glicosiladas, contendo carboidratos ligados em suas cadeias laterais (KUBELKA et al., 1995).

As fosfolipases e a hialuronidases são capazes de provocar reações imunológicas intensas, sendo consideradas responsáveis pelo início das manifestações alérgicas, induzindo a produção de IgE específica, causando hipersensibilidade em algumas pessoas (DOTIMAS; HIDER, 1987).

Três serino-proteases foram isoladas do veneno de *B. pennsylvanicus* e do veneno das vespas européias *P.dominulus* e *P.exclamans*, as quais demonstraram um elevado grau de resíduos conservados em suas seqüências primárias. Além disso, todas apresentaram atividades significativas de respostas à IgE-específica (WINNINGHAM et al., 2004).

Além das proteínas clássicas dos himenópteros, Santos (2006) identificou outras proteínas nunca descritas nesses venenos, como Arginina Quinases, Proteínas de Choque Térmico, Tropomiosina, Alfa-Glicosidase e Superóxido Dismutases.

As seqüências primárias do Antígeno-5 de quinze espécies de vespas já foram descritas, sendo que a maioria de suas seqüências N-terminais se mostraram bastante conservadas (HOFFMAN, 1993). Embora alguns estudos demonstrem a ação alergênica do Antígeno 5, ele não apresenta uma função biológica (fisiológica e/ou farmacológica) conhecida.

Santos (2007) identificou 6 isoformas do alérgeno Antígeno-5 e uma do alérgeno Sol i III (análogo do antígeno 5 em formigas) no veneno da vespa *Polybia paulista* por abordagens proteômicas. Além disso, também foi demonstrada elevada similaridade entre o Antígeno-5 de *P. paulista* e *P. scutellaris*. À partir da comparação entre as estruturas primárias dos antígeno-5 de vespas descritas na literatura, e tendo conhecimento da estrutura tridimensional do Antígeno-5 da vespa *Vespula vulgaris*, obtido por cristalografia de raios-X, a mesma foi utilizada como molde (template) para modelagem da estrutura tridimensional do alérgeno Antígeno 5 do veneno da vespa social *Polybia paulista* (SANTOS, 2007).

2.3 Alergia aos venenos de Himenópteros.

Os insetos Hymenoptera são responsáveis por um grande número de acidentes por ferroadas e causam reações locais severas, reações anafiláticas e reações tóxicas. Enquanto as reações locais limitadas a dor e inchaço são raramente perigosas, as reações alérgicas sistêmicas podem ser

leves (reação local), moderadas (angiodema, asma e dor abdominal) ou severas (edema de glote, contrações pulmonares e perda de consciência) (EVAN, 1998). As reações vasculares envolvem o sistema circulatório, muitas vezes promovendo a queda de pressão arterial e o aumento da permeabilidade vascular. Já as reações respiratórias consistem em inchaços ou aumento de fluídos no sistema respiratório. São caracterizadas por dificuldade de respirar, espirros, edema de glote, contração do pulmão, dispnéia e asma. Em pacientes sensíveis, podem ocorrer ainda, distúrbios gastrointestinais, cólicas, diarreia, náusea, vômito, incontinência, dor de cabeça, calafrio e febre (SCHMIDT, 1986).

A alergia ao veneno de himenópteros ao redor do mundo é geralmente causada por ferroadas de vespas dos gêneros: *Vespula* (e.x., *Vespalavulgaris*, *V. germanica* and *V. maculifrons*), *Vespa* (*Vespa crabro*), *Dolichovespula* (*Dolichovespula maculate*, *D. media*), *Polybia* (*P. paulista*) e *Polistes* (*Polistes gallicus*, *P. dominulus*, *P. annularis*, *P. exclamans*) e por abelhas dos gêneros *Apis* (*Apis mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata*) e *Bombus* (*Bombus terrestris*, *B. pennsylvanicus*). Dois gêneros de formigas também são importantes: *Solenopsis* (*Solenopsis invicta*, *S. geminata*) e *Myrmecia* (*Myrmecia pilosula*). (GRAAF et al, 2009).

Os tratamentos utilizados nos processos de sensibilização de pacientes são processos de imunoterapia específica, onde pequenas doses de veneno bruto são injetadas no indivíduo alérgico. A imunidade ocorre quando há um aumento de anticorpos IgG e a diminuição de IgE no organismo do indivíduo alérgico (KING, 1996). O número estimado de pacientes sensibilizados é entre 9,3% e 28,5% da população mundial, porém testes realizados no Brasil com extratos comerciais oriundos de outros países podem levar pacientes sensibilizados a apresentarem testes cutâneos do tipo “falso-negativo” (ANTONICELLI et al., 2002). Estudos demonstraram que alguns pacientes ferroados por esses insetos não apresentaram nenhum tipo de sintoma, porém testes demonstraram a presença da IgE-específica, notificando que os mesmos estão predispostos a desenvolver reações alérgicas em um futuro acidente (NITTNER-MARSZALSHA et al., 2004).

Muitos pacientes alérgicos a venenos de vespas exibem reações para mais de um veneno de vespa, o que pode ser causado pela reatividade cruzada de um ou mais alérgenos (KING et al., 1996). A reatividade cruzada é devido a alérgenos homólogos de diferentes espécies que estimulam a produção de epítopos comuns

reativos à IgE específica (HOFFMAN, 1985). O modelo de reatividade cruzada entre diferentes alérgenos está relacionado principalmente à similaridade entre suas seqüências primárias, uma vez que os anticorpos são produzidos contra regiões altamente conservadas (BARLOW et al., 1986).

A reatividade cruzada foi observada entre as hialuronidases de abelhas e vespas (HOFFMAN, 2006). A reatividade cruzada entre as proteínas dos venenos de vespas européias do gênero *Polistes* foram estudadas por testes sorológicos, os quais demonstraram a similaridade dos alérgenos dessas espécies. Um grau menor de similaridade foi demonstrado entre os venenos das vespas dos gêneros *Dolichovespula* e *Vespula* (PANTERA et al, 2003).

A investigação de reações cruzadas com os soros dos pacientes sensíveis aos venenos da abelha *Apis mellifera* e das vespas sociais *Agelaia pallipes pallipes* e *Polybia paulista* frente ao veneno da vespa *P. paulista*, revelou que o Antígeno 5 é o alérgeno imunoreativo comum entre esses venenos (SANTOS, 2007).

Estudos realizados com anti-soros dos venenos de abelhas (*Apis mellifera*) e de vespas (*Vespula arenaria*, *V. vulgaris* e *V. maculata*) mostram que os anti-soros de abelhas foram capazes de neutralizar a atividade da fosfolipase A2 de abelhas, porém anti-soros de vespas não tiveram o mesmo sucesso, permitindo a ação das fosfolipases A2 de vespas (NAIR et al., 1976).

Dentre os himenópteros sociais, os venenos de abelhas e vespas endêmicos do hemisfério norte têm sido extensivamente estudados e muitos de seus componentes moleculares, já foram isolados e identificados, enquanto que os componentes dos venenos das espécies Neotropicais como o Brasil, estão sendo estudados mais recentemente.

2.4 Análise Proteômica.

O termo “proteoma” foi introduzido há 10 anos atrás e descrito como “todas as proteínas expressas em um genoma ou tecido” (WILKINS et al., 1997). Existem diferenças entre a bioquímica de proteínas tradicional e a proteômica. Ambas envolvem identificação de proteínas, mas a proteômica é o estudo de sistemas de

múltiplas proteínas. As análises são direcionadas às misturas complexas e suas identificações não são realizadas pela análise completa da sequência da proteína, mas por análises de sequências parciais, com o auxílio de ferramentas de bioinformática. O contexto do proteoma é o estudo das proteínas de um sistema biológico, associado à caracterização das respostas moleculares desse sistema num determinado momento (PLEBANI, 2005).

São descritos cinco ramos do Proteoma que abrangem toda a aplicação experimental descrita até o momento:

1) Proteoma de Expressão de Proteínas, que estuda a expressão de proteínas quando o sistema biológico é exposto a drogas ou estímulos físicos, além de identificar novas proteínas como marcadores específicos de doenças. Jeong et al (2003) identificaram proteínas de tecidos que são diferencialmente expressas em ratos que apresentaram asma alérgica. Este trabalho sugere que essas proteínas são eficientes biomarcadores para monitoramento quantitativo da progressão da doença ou respostas às terapias. A doença ou Linfoma de Hodgkin, é um câncer que se origina nos linfonodos (gânglios) do sistema linfático e surge quando um linfócito (mais frequentemente um linfócito B) se transforma em uma célula maligna, capaz de crescer descontroladamente e disseminar-se. Realizou-se a comparação do perfil protéico entre células saudáveis e células malignas desta doença, encontrando proteínas presentes em outros tipos de câncer e proteínas específicas dessa doença (ANTONUCCI, 2003).

2) Proteoma Estrutural, no qual o principal objetivo é mapear a estrutura de complexos protéicos e interação entre proteínas. As informações sobre as estruturas tridimensionais são obtidas primeiramente através de técnicas de cristalografia de raio-X e Ressonância Magnética Nuclear 2D, embora uma variedade de técnicas adicionais adicionem informações muito importantes no conhecimento estrutural das proteínas (BRADSHAW et al, 2005). Tang (2006) realizou o estudo das proteínas relacionadas com as interações entre células epiteliais e conseguiu identificar 912 proteínas. Essa análise proteômica auxiliado pelas ferramentas bioinformática possibilitou uma maior compreensão das proteínas relacionadas à configuração, função molecular, função celular e processos especializados presentes neste tipo de interação.

3) Proteoma funcional, o qual estuda as interações entre proteínas e entre proteínas e/ou outras moléculas tendo como função determinar quais proteínas

interagem em sistemas organizados e qual a função das mesmas (YATES, 2000). Os estudos de interação proteína-proteína ocorrem em uma grande variedade de organismos, incluindo procariotos (RAIN et al., 2001), leveduras (ITO et al., 2000), e organismos multicelulares como *Caenorhabditis elegans* (WALHOUT et al., 2000). Rain et al (2001) elaboraram um mapa em grande escala da interação proteína-proteína do patógeno gástrico *Helicobacter pylori* (agente causador da úlcera e gastrite), onde 1.200 interações foram identificadas entre as proteínas do patógeno, reconhecendo em torno de 46.6% de seu proteoma.

4) Proteoma de Mapeamento das modificações químicas de proteínas, o qual envolve a identificação de como e onde as proteínas são modificadas, estabelecendo a natureza das modificações pós-traducionais (PLEBANI, 2005). A maioria das modificações nas proteínas altera a atividade e/ou localização celular e a identificação das mesmas, sendo que o estudo delas é parte fundamental para compreender suas funções (BRADSHAW et al, 2005). Fosforilação e glicosilação são as mais conhecidas modificações e controlam o comportamento protéico, por exemplo, ativando ou inativando uma enzima (PAWSON, 2002). Beck et al (2006) fizeram uma análise qualitativa e quantitativa das histonas extraídas de células cancerígenas, observando um total de 32 acetilações, metilações, e ubiquitinações localizadas em histonas H2A, H2B, H3, e H4, incluindo sete novas modificações.

5) Proteoma Qualitativo, o qual identifica todas as proteínas do sistema biológico em estudo, a fim de compreender os mecanismos de ação dessas proteínas no organismo em estudo (PLEBANI, 2005). Este tipo de proteoma é bastante encontrado em estudos de venenos de himenópteros.

A engenharia proteômica tem desenvolvido microtécnicas que possibilitam a caracterização molecular de componentes bioativos, presentes em diferentes tipos de células, tecidos, extratos e/ou fluídos corporais (HEINE, 1997; RESING et al., 1999; PANDEY et al., 2000). O proteoma da bactéria *Mycoplasma pneumoniae*, um patógeno humano, foi realizado sendo que quatro proteínas foram identificadas (REGULA et al, 2000).

Santos et al. (2005) e Sato et al. (2004) elucidaram seqüências parciais das proteínas da família das MRJPs (*Major Royal Jelly Protein*) da geléia real de *Apis mellifera* africanizada e européia, respectivamente, através da análise proteômica clássica. Esses estudos contribuíram para elucidar o papel das glândulas produtoras da geléia real na diferenciação da prole, além de fornecer dados importantes para o

desenvolvimento de novos extratos para dessensibilização de pacientes sensíveis. Mais recentemente, Schönleben et al (2007), aplicaram diferentes métodos de fracionamento e separação das proteínas da geléia real, sendo que 20 diferentes proteínas foram identificadas, além de estudarem a fosforilação das proteínas da geléia real.

A análise proteômica de alguns venenos de himenópteros já foi realizada. O estudo do veneno da abelha *Apis mellifera carniça* identificou 49 proteínas, entre elas fosfolipases A2, hialuronidase, melitina, serino-proteases, fosfatases ácidas, Api m 6 (alérgeno) e proteínas de veneno –I, -II e –III, cuja função ainda é desconhecida (PEIREN et al., 2005). O proteoma do veneno da formiga *Myrmecia pilosula*, caracterizou seis proteínas com massas moleculares entre 26 e 90 KDa, porém ainda não foram identificadas (WIESE et al., 2006).

Santos (2007) identificou 94 proteínas do extrato bruto da vespa social *Polybia paulista*, por abordagem proteômica. Dezesesseis dessas proteínas se mostraram imunoreativas à IgE-específica do soro de pacientes alérgicos ao veneno desta vespa.

O número de estruturas tridimensionais disponíveis em bancos de dados como o PDB (Protein Data Bank) aumentou muito (BERMAN et al., 2000), levando à criação de uma sub-disciplina da bioinformática: a bioinformática estrutural. O principal foco desta sub-disciplina é a representação, armazenamento, recuperação, análise e visualização da informação estrutural a níveis atômicos. Assim, a predição de estruturas tridimensionais de proteínas permanece uma área de grande interesse, sendo que a principal categoria de predições de estruturas de proteínas tem sido a modelagem molecular comparativa, baseada na alta homologia de uma sequência por uma estrutura conhecida (SANCHEZ et al., 1997). A modelagem molecular permite, com base nos conhecimentos da estereoquímica dos aminoácidos e nas informações contidas nas estruturas terciárias resolvidas experimentalmente, prever a conformação de proteínas a partir da sequência primária de seus aminoácidos (DE LIMA, 2006), com o potencial de gerar modelos confiáveis (LESK, 2001).

No Brasil, existem mais de 400 espécies conhecidas de vespas neotropicais. Para melhor atendimento ao paciente ferroadado por alguma espécie de vespa, necessita-se conhecer detalhadamente este inseto. As informações sobre

taxonomia, comportamento, distribuição geográfica e componentes químicos de seus venenos são fundamentais para maior conhecimento sobre as espécies e melhor atendimento às possíveis vítimas de ferroadas. A vespa *Polistes lanio lanio* é uma espécie muito comum no sudeste do Brasil. Esta espécie vive em pequenas colônias localizadas frequentemente perto de habitações humanas (YSHII ET AL, 2008), sendo este o principal motivo de ser uma das vespas sociais que mais causam acidentes no Estado de São Paulo. As vespas do gênero *Polistes* são capazes de ferroadar múltiplas vezes, por não apresentarem autotomia do aparelho de ferrão e causar reações alérgicas severas (STEEN et al., 2005).

Assim, a identificação das proteínas mais abundantes do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio*, junto à caracterização de proteínas por uma abordagem proteômica, se faz necessária para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação desse veneno.

3. OBJETIVOS

A caracterização molecular das proteínas do veneno das vespas sociais predominantes no Sudeste do Brasil é de fundamental importância para a melhor compreensão dos mecanismos de ação destes compostos, uma vez que, diversos casos de reações alérgicas e anafiláticas são documentados todos os anos. A fim de conhecer melhor as propriedades bioquímicas e imunológicas da mais abundante proteína do veneno da vespa *P. lanio lanio*, e contribuir para o desenvolvimento de extratos mais específicos, este trabalho teve como objetivos:

- Identificar as proteínas mais abundantes do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* por abordagem proteômica, envolvendo a combinação de eletroforese bidimensional, sequenciamento por técnicas de espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF e por Química Degradativa de Edman, além das ferramentas de Bionformática Proteômica.
- Caracterizar bioquimicamente todas as isoformas do alérgeno Arginina Quinase (AQ), identificando-as por análise proteômica e Espectrometria de Massas;
- Obter as seqüências primária dos fragmentos peptídicos gerados nas digestões enzimáticas a que foram submetidas as isoformas de AQ;
- Alinhar os trechos de seqüências primárias obtidos para se obter a seqüência primária completa das AQ;
- Realizar a modelagem molecular por homologia das isoformas de AQ e avaliar o modelo estrutural obtido para estudo estrutural e funcional da proteína.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do veneno da vespa *Polistes lanio lanio*

Os insetos da espécie *Polistes lanio lanio* foram fornecidos pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais / Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro-SP. Os insetos foram coletados e imediatamente congelados a -80°C , sendo sua identificação taxonômica verificada. As vespas foram dissecadas e o reservatório do veneno extraído de cada inseto, com o uso de microbisturís. Estes reservatórios foram lavados, perfurados e agitados em solução contendo 1 mM de FenilMetilSulfonilFluoride (PMSF), e centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi usado como extrato bruto do veneno. Este extrato foi dialisado contra água destilada durante a noite (18 h) à 4°C , a fim de retirar o excesso de sal que naturalmente ocorre nesses venenos, uma vez que, eventuais problemas podem ocorrer na focalização isoelétrica da eletroforese bidimensional se a amostra apresentar impurezas, interferentes ou uma elevada quantidade de sal.

4.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BioRad), utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

4.3 Eletroforese bidimensional

Para a realização da primeira dimensão foram utilizadas fitas de *gradiente imobilizado de pH* (IPG) para o intervalo de valores de ponto isoelétrico entre 3 e 10, com 7 cm de comprimento. Estas fitas foram rehidratadas durante a noite, à temperatura ambiente, em 125 μL de uma solução de rehidratação, contendo uréia 8M, CHAPS 2% (v/v), solução tampão para IPG a 1% (v/v), DDT 19 mM e azul de bromofenol a 0,005%(v/w), juntamente com 400 μg de veneno bruto dialisado. As proteínas foram separadas conforme seus diferentes pontos isoelétricos utilizando três passos: 1º) 200 V por 2hs, 2º) 1000 V por 1hr e 3º) 5000V por 1:30 hs. Em seguida, as fitas foram equilibradas por 20 minutos em presença de DTT 19 mM,

Tris 50 mM, uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), e posteriormente por mais 20 minutos, na mesma solução, exceto pela substituição do DTT por Iodoacetamida 0,2M.

Para a realização da segunda dimensão, a fita de gradiente de pH oriunda da primeira dimensão foi colocada no topo de um gel de poliacrilamida a 15% (m/v). Nesta etapa, foi utilizado um padrão de baixo massa molecular (GE Healthcare) para auxiliar na caracterização das proteínas em estudo.

A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente, utilizando-se duas etapas com os seguintes parâmetros: 10 mA por gel por 15 minutos e 20 mA por gel por 1 hora. Após a segunda dimensão, as proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB).

4.4 Aquisição das Imagens

Os géis de eletroforese bidimensional foram corados com CBB e as imagens foram adquiridas utilizando-se um fotodocumentador modelo BioImage (GE Healthcare) no modo transparência, conectado a um computador, com uma resolução de 400 dpis para fotodocumentação. As imagens foram analisadas no software Image Master Elite (GE Healthcare).

4.5 Eletrotransferência

A técnica de eletrotransferência ou *Western blotting* consiste na transferência eletroforética de proteínas separadas por eletroforese para uma matriz suporte de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) ou nitrocelulose em solução tampão de transferência composta por Tris 20 mM pH 8,3, Glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v) e metanol a 10% (v/v).

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas do gel para membranas de PVDF ou nitrocelulose, com o auxílio da cuba de eletrotransferência Semi-Dry TE 70 (GE Healthcare).

Em um reservatório contendo tampão de transferência foi montado um “sanduíche” na seguinte ordem: três folhas de papel de filtro comum e uma membrana, gel, três folhas de papel de filtro comum; este conjunto permaneceu em repouso por 10 minutos para o equilíbrio de todo sistema no tampão de

transferência. É necessário ressaltar que, as membranas foram hidratadas por 15 segundos em metanol (PVDF) ou água (nitrocelulose) antes de inseri-la no tampão de transferência. Estes procedimentos foram realizados com luvas para evitar contaminação da membrana.

O conjunto foi colocado rapidamente na cuba de transferência na seguinte ordem: a partir do cátodo da cuba, primeiramente os três papéis filtro, o gel equilibrado, a membrana e os mais três papéis filtro. Os parâmetros utilizados foram: 250 V, 100 mA por 1 hora para os géis de 8 x 8 cm. Após a eletrotransferência a membrana foi corada com Ponceau a fim de testemunhar a eficiência da transferência. A membrana foi então descorada com água para remover o corante.

Em seguida, a membrana eletrotransferida foi submetida à coloração de CBB a fim de visualização dos *spots* de proteínas, que foram então recortados e submetidos ao Sequenciamento por Química Degradativa de Edman. A membrana foi lavada com água destilada por 3 vezes de 5 a 10 minutos; em seguida, corada com CBB R-250 a 0,025% (m/v) em metanol 40% (v/v) por 5 minutos e descorada com metanol 50% por 20 minutos. A membrana foi lavada com água destilada por 15 minutos e seca a temperatura ambiente por 12 horas antes de submetê-la ao sequenciamento por Química Degradativa de Edman.

4.6 Microsequenciamento por Química Degradativa de Edman

As seqüências de aminoácidos da região N-terminal das proteínas foram obtidas, utilizando-se um seqüenciador automático de marca Shimadzu, mod. PPSQ-21 A (Shimadzu), baseado na Química Degradativa de Edman.

4.7 Microsequenciamento por Espectrometria de massas MS/MS

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados em um Espectrômetro de Massas do tipo MALDI-TOF/TOF, marca Applied Biosciences, modelo 4000, adquiridos pela FAPERJ e instalados no Laboratório de Toxinologia Aplicada na Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) no Rio de Janeiro, RJ.

Inicialmente foi realizado um protocolo de identificação de “impressão digital peptídica” (PMF) baseado na digestão das proteínas *in gel*, seguido da medida das massas dos fragmentos peptídeos resultantes. Esses fragmentos foram submetidos

à Espectrometria de Massas Tandem (MS/MS) para a obtenção de suas seqüências peptídicas.

As manchas de proteínas coradas com CBB, foram recortadas do gel, descolorida com solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e acetonitrila 50%, desidratada com 100% de acetonitrila, sendo então o pedaço de gel seco por centrifugação à vácuo. Em seguida, as proteínas presentes nestes pedaços de géis foram digeridos separadamente com a enzima Tripsina.

O protocolo utilizado foi: o gel desidratado foi incubado com 0,4 µg da enzima tripsina em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0 durante 18 horas a 37°C. As digestões foram interrompidas adicionando-se 150 µL de solução de acetonitrila 50% (v/v) em água destilada [contendo ácido trifluoracético a 5% (v/v)] e mantendo-se as suspensões dos géis em repouso a temperatura ambiente por 30 min; em seguida, as suspensões contendo os géis foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e secos por centrifugação a vácuo, sendo então mantidos -20°C até serem analisados por Espectrometria de Massas.

Para a análise da amostra no espectrômetro de Massas, as amostras foram reconstituídas adicionando-se 5 µL de solução de acetonitrila 50% (v/v) [contendo TFA 0,5% (v/v)] e solubilizando os peptídeos gerados durante a digestão enzimática; 0,3 µL desta solução foi aplicada na sonda de amostras do espectrômetro, deixando-a secar. Sobre a amostra seca foram adicionados 0,3 µL de solução saturada de ácido cinâmico, deixando-a secar novamente, quando foram finalmente realizadas as medidas de massas.

A potência do laser (Nd:Yag – 355nm) foi ajustada para se obter o melhor sinal, tanto para experimentos de MS como MS/MS. Os espectros de massas foram adquiridos a partir dos picos monisotópicos na faixa de m/z de 800 a 3500. Para experimentos de MS/MS os cinco íons mais intensos de cada espectro MS foram selecionados. O modo reflectron foi utilizado em todas as análises. Após todas as aquisições de dados, os mesmos foram exportados no formato texto, para serem utilizados ou então, submetidos à análise automática com a ferramenta de bioinformática MASCOT.

4.8 Identificação das Proteínas

Os bancos de dados utilizados para as identificações de proteínas foram: *Protein Data Bank* (PDB) e o *GenBank* (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/>). O programa GPS Explorer (Applied Biosystems) foi utilizado para submeter os dados de MS e MS/MS no “MASCOT protein engine search” (<http://www.matrixscience.com>) baseando-se no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) com a busca restrita à taxonomia: *Arthropod*. Os parâmetros utilizados para a busca foram: tolerância de massa do peptídeo de 100 ppm e número de clivagens faltante = 1. Para modificações dos peptídeos, foram consideradas: carbamidometilação e oxidação da metionina. Os valores de “íon score” considerados significantes foram os maiores que 30 e os valores de “protein score” significantes os maiores que 60. A comparação entre as massas teóricas e experimentais e PI (ponto isoelétrico) também foram consideradas para as identificações.

4.9 Modelagem Molecular por Homologia

A modelagem molecular por homologia é uma técnica de desenvolvimento de modelos tridimensionais que parte de uma sequência primária conhecida de uma proteína cuja estrutura tridimensional é indeterminada e utiliza como molde uma ou mais seqüências de proteínas cujas estruturas tridimensionais já foram resolvidas por técnicas experimentais e, que possuem alta similaridade com a proteína de interesse (GIBAS et al., 2001). Consiste de quatro etapas principais que são (SANCHEZ et al., 1997): 1) Busca e seleção do molde: consiste em realizar uma busca por proteínas que possuem suas estruturas tridimensionais resolvidas. Esta busca é realizada em bancos de dados de estruturas terciárias de proteínas, sendo que o principal deles é o *Protein Data Bank* (PDB - BERMAN, et al. 2000). O principal parâmetro usado para realizar a busca do molde é a porcentagem de identidade entre a seqüência de aminoácidos do molde e a seqüência da proteína que será modelada (modelo). 2) Alinhamento: depois de escolhido o molde é necessário realizar o alinhamento da seqüência do molde com a seqüência da proteína a ser modelada, de forma que se possa aproveitar melhor a porcentagem de identidade entre eles. Este segundo alinhamento é formatado e utilizado como arquivo de entrada durante a modelagem. Existem vários algoritmos de alinhamento,

entre os quais podem ser citado o BLASTP (BOURNE et al., 2003) que foi utilizado neste trabalho; 3) Modelagem: nesta etapa, o software escolhido irá receber como entrada o arquivo contendo as seqüências alinhadas e o arquivo contendo as coordenadas tridimensionais do molde. Dessa forma, o programa irá construir a estrutura tridimensional da proteína alvo baseado nas coordenadas tridimensionais do molde; 4) Análise: a última etapa será fazer a análise da estrutura gerada. Esta análise consiste em estudar as posições atômicas dos modelos de modo que possa determinar a qualidade estereoquímica do modelo da proteína em questão.

Caso o modelo apresente uma boa qualidade estereoquímica, ele poderá ser aceito como um modelo confiável para auxiliar no estudo estrutural e funcional desta proteína, além de poder contribuir para o desenvolvimento de drogas baseado em estrutura. Com exceção da etapa de análise, todas as outras etapas acima descritas podem ser realizadas pelo programa MODELLER (SANCHEZ et al., 1997), que realiza a modelagem por homologia de estruturas de proteínas por satisfação de restrições espaciais. No presente estudo utilizou-se a versão 9v4 do programa.

4.10 Avaliação do Modelo Estrutural

O modelo pode ser avaliado como um todo, bem como em regiões individuais. Como a qualidade do modelo depende em grande parte do molde utilizado, é preciso que este tenha sido obtido em alta resolução ($\leq 2\text{\AA}$) e com um fator-R satisfatório ($\leq 20\%$). A qualidade do modelo construído será proporcional à qualidade da estrutura tridimensional utilizada como molde (SANCHEZ et al., 1998).

4.10.1 Procheck

O programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1994) analisa a geometria global da estrutura ou cada resíduo individualmente, utilizando parâmetros estereoquímicos derivados de estruturas de alta resolução ou bem refinadas (MORRIS et al., 1992), que constituem sua base de dados. Trata-se de um programa pertencente ao pacote CCP4 (*Collaborative Computational Project No 4*) utilizado para verificar a qualidade estereoquímica de proteínas.

Os parâmetros estereoquímicos usados são aqueles descritos por Morris et al. (1992). Estes parâmetros utilizados como informações estereoquímicas checadas

pelo programa são: ligações covalentes, planaridade de grupos planares (aromáticos, ligações peptídicas, etc.) ângulos diédricos, quiralidade, interações não covalentes, ligações de hidrogênio da cadeia principal e pontes de dissulfeto. Os resultados são apresentados em vários arquivos diferentes, entre estes arquivos foram escolhidos o Gráfico de *Ramachandran* para analisar a qualidade estereoquímica dos modelos construídos, pois representa através de um plano, a posição dos aminoácidos de acordo com os ângulos de torção ϕ e ψ formados entre o carbono- α e o nitrogênio ($C\alpha-N$) e os ângulos formados entre o carbono e o carbono- α ($C-C\alpha$) respectivamente e o *G-factor* para verificar os comprimentos de ligação de cadeia principal, ângulos da cadeia principal, distribuição dos ângulos Φ/ψ , distribuição dos ângulos χ_1/χ_2 e ω .

Em princípio, ϕ e ψ podem ter qualquer valores entre -180° e $+180^\circ$, porém, muitos valores dos ângulos ϕ e ψ são proibidos pelas interferências estéricas entre átomos pertencentes ao mesmo esqueleto polipeptídico e pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (GIBAS et al., 2001).

O *G-factor* fornece uma medida do desvio de uma dada propriedade estereoquímica (ângulos de torção e geometria covalente), baseado nas distribuições observadas nos parâmetros estereoquímicos em sua base de dados e uma medida da normalidade da estrutura como um todo. O cálculo do *G-factor* global envolve os diversos *G-factors* para toda a estrutura, num único número. O *G-factor* global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula. Por exemplo, os resíduos que caem nas regiões não permitidas do diagrama de *Ramachandran* terão um *G-factor* baixo (ou muito negativo). Se uma proteína tiver muitos resíduos com *G-factor* baixo sugere que algo pode estar errado com a geometria total da proteína avaliada.

4.10.2 Verify 3D

O *Verify 3D* (BOWIE et al., 1991; LUTHY et al., 1992; KABSCH et al., 1983) mede a compatibilidade entre a seqüência de aminoácidos de uma proteína e o modelo da sua estrutura tridimensional, usando um perfil 3D. Lüthy et al. (1992)

determinaram empiricamente o índice global esperado de $Scalc = \exp(-0,83 + 1,008 \times \ln(L))$ de compatibilidade entre a seqüência e a estrutura tridimensional onde L é o comprimento da seqüência e Scalc representando, então, a soma das probabilidades individuais dos resíduos. O parâmetro utilizado para escolher um modelo compatível é o limite de 45% para a confiabilidade da compatibilidade seqüência/estrutura. Valores menores que 45% indicam uma estrutura incorreta, valores em torno de 45% podem estar corretas, mas possuem qualidade questionável e valores acima de 45% indicam uma estrutura correta.

O resultado é uma medida da compatibilidade entre a seqüência e sua estrutura 3D descrita pelo seu perfil tridimensional. O Verify 3D requer como entrada um arquivo de coordenadas atômicas no formato pdb.

4.10.3 RMSD da geometria ideal

O desvio médio quadrático (RMSD) da geometria ideal (KEARSLEY, 1989) é calculado como uma função de todos os átomos de uma proteína, e podemos adotar a definição que o RMSD da geometria ideal serve para analisar a medida da variação da posição de cada átomo de uma estrutura com relação aos parâmetros observados por Engh et al. (1991). O RMSD da geometria ideal utiliza como parâmetros o comprimento e ângulo de ligação ideal, derivados de uma análise detalhada (ENGH et al., 1991) de estruturas de pequenas moléculas em *Cambridge Structural Database* (CSD) (ALLEN et al., 1979). O programa utilizado para executar os cálculos de comprimento e ângulos de ligação foi o programa X-PLOR (SCHWIETERS et al., 2003; BRÜNGER, 1992).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* com solução contendo inibidores de proteases, o extrato coletado foi dialisado, concentrado, liofilizado e, em seguida, foi submetido à eletroforese bidimensional. Primeiramente, as proteínas foram separadas por carga através de seus pontos isoelétricos com fitas de pl de 3 a 10 e numa segunda etapa, elas foram separadas por massa molecular através de um gel SDS-PAGE 15% (m/v). O fracionamento do veneno bruto por eletroforese bidimensional resultou num perfil protéico com 171 *spots*, ou seja, 171 prováveis proteínas com massas moleculares entre 97 kDa e 14.4 kDa e pontos isoelétrico entre 3 e 10 (Figura 1).

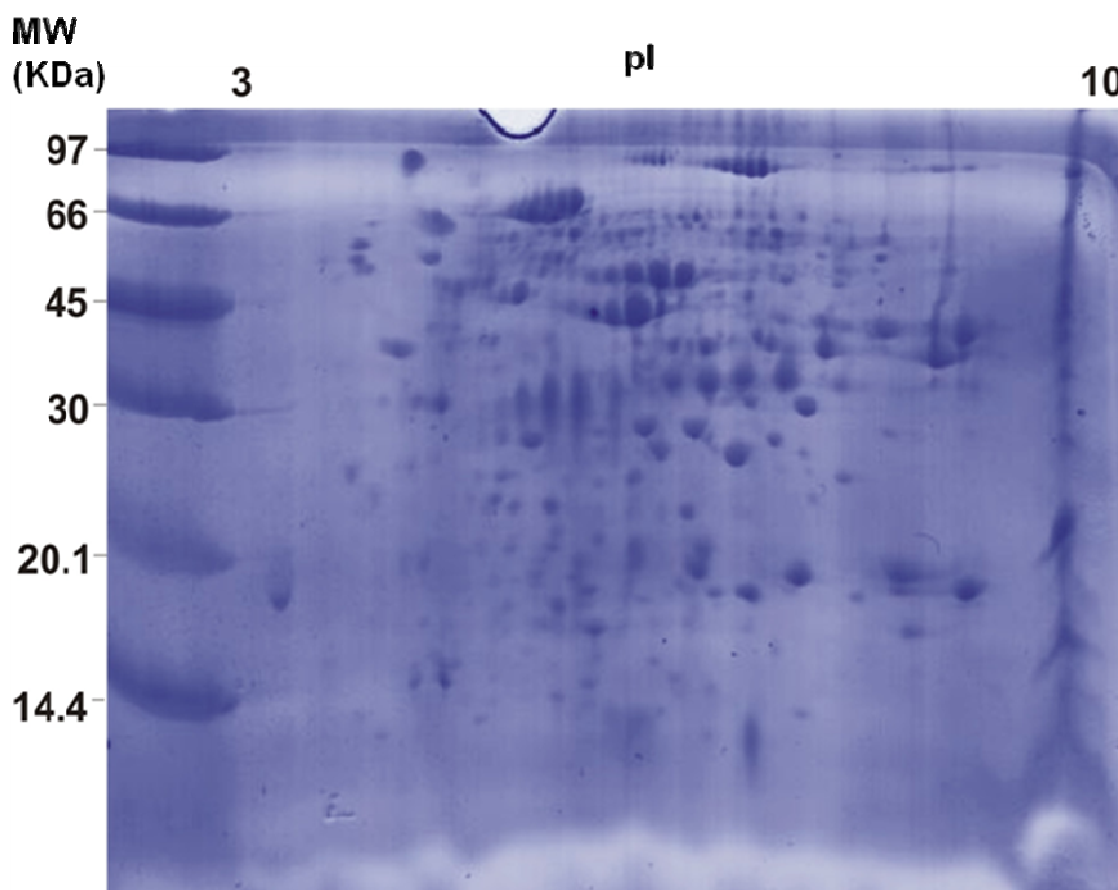


FIGURA 1: Gel de Eletroforese Bidimensional em SDS-PAGE 15%(m/v) do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio*. As proteínas foram focalizadas em fitas de pl de 3 a 10, com 7 cm de comprimento. Cerca de 171 spots foram detectados.

As proteínas mais abundantes foram excisadas do gel, descoradas e submetidas à digestão trípica. Os fragmentos peptídicos foram submetidos à análises de massas em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF/ToF para o sequenciamento de alguns fragmentos trípticos e identificação individual das

proteínas. Paralelamente, géis contendo o mesmo perfil protéico foram submetidos à eletrotransferência em PVDF para serem submetidas ao seqüenciamento peptídico por Química Degradativa de Edman. Com o auxílio das ferramentas de bioinformáticas descritas anteriormente, cerca de vinte proteínas foram identificadas; a Figura 2 mostra os spots das proteínas que foram identificadas.

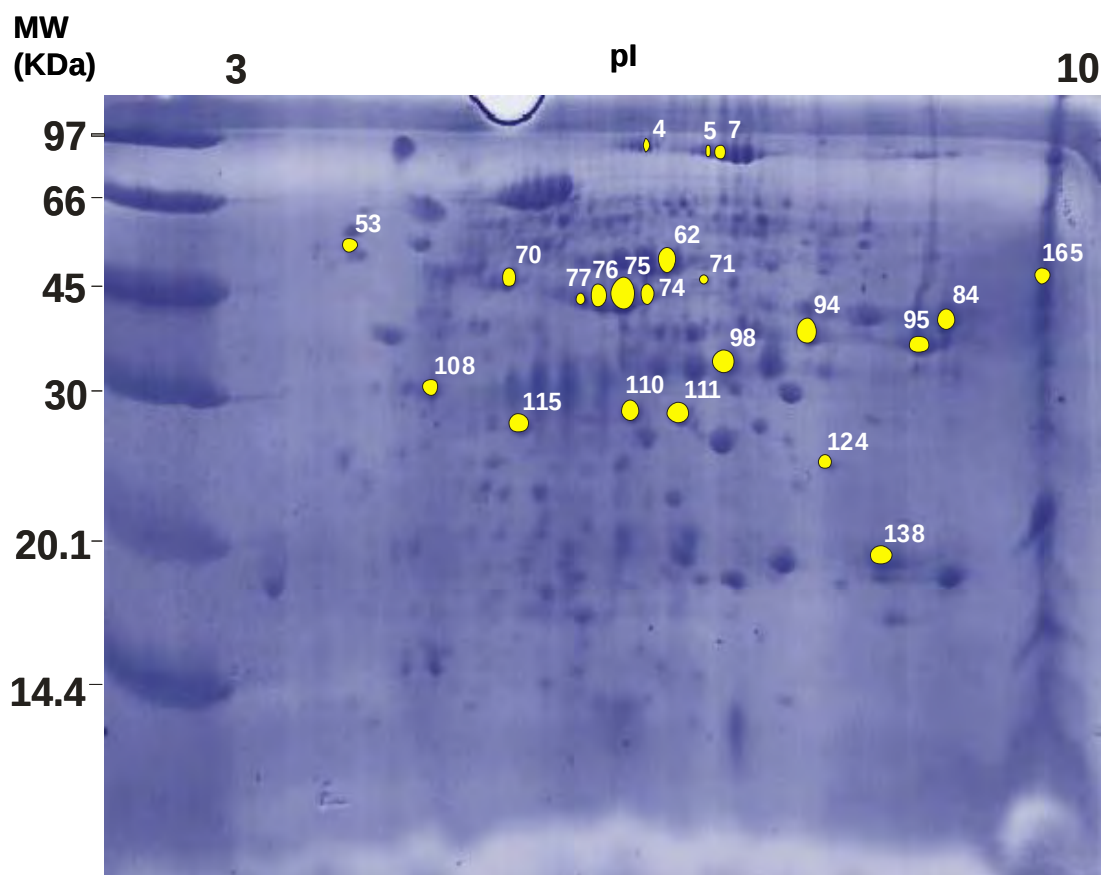


FIGURA 2: Gel de Eletroforese Bidimensional em SDS-PAGE 15%(m/v) do veneno da vespa social *Polistes sp.* Os spots assinalados em amarelo indicam as proteínas identificadas neste estudo por espectrometria de massas.

As sequências parciais das proteínas foram analisadas por comparação, contra bancos de sequências de proteínas, utilizando-se de servidores públicos disponíveis na rede mundial de computadores. Dentre as proteínas identificadas, quatro (spots 74, 75, 76 e 77) foram identificadas como arginina quinase. Outras proteínas entre elas: proteínas de choque térmico (spot 70), superóxido desmutase (spot x) e inibidores de serino protease (spots x) foram identificadas. A tabela 1 mostra as identificações de proteínas do veneno de *P. lanio lanio*, com seus respectivos códigos de acesso massas moleculares (KDa), pontos isoelétricos (pI) e scores.

TABELA 1: Identificação das proteínas constituintes do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* (Hymenoptera, Vespidae).

Spot:	Identificação	Código de acesso	MM (kDa)	pI	Mascot Score	Ion Score Total	Sequência
4	Inibidor de serino protease	ABC02759	80.3	5.9	55.1	50	MCKCPGINSVPCGVNGK CKGECPCVACRCLPIK
5	Inibidor de serino protease	ABC02759	78.7	6.5	58.5	46	VCIGRRPVCGANGKTFK CDGECPCPTCTCPRIR
7	Inibidor de serino protease	ABB89133	78.2	6.7	50.1	26	KTYPNPCSAGCENVPV R VKCDGECPCPTCTCPR CDGECPCPTCTCPRIR
53	Inibidor de serino protease	ABC02759	57.2	3.8	66.2	45	VKCDGECPCPTCTCPR GCACPFNLKPVCVGD K KTYPNSCTASCKHVK
138	Inibidor de serino protease	A0S0Q1	20	8.4	44.8	21	EMEHGCMK
71	Proteína de choque térmico hsp 70	ABU63810	50.9	6.5	291	98	APAVGIDLGTTYSCVGV FQHGK
115	Proteína de choque térmico hsp21.4	Q5R1P5	31	4.9	44.3	98	LGDFSVIDTEFSNIR
124	Superoxido dismutase	AAP93582	27.3	7.8	139	91	HHATYVNNLNVAEEK
74	Arginina Quinase	A8VVY3	48.9	5.9	198	184	DFGDVDSLGNLDPAGE FIVSTR
75	Arginina Quinase	ABH04187	48.2	5.7	189	171	DFGDVDSLGNLDPAGE FIVSTR
76	Arginina Quinase	A5JDM1	47.6	5.4	207	169	DFGDVDSLGNLDPAGE FIVSTR
77	Arginina Quinase	A5HUI6	47.3	5.6	271	88	TFLVWCNEEDHLR
98	Proteína alergênica do grupo 15	Q4JK69	38.3	6.7	185	3	IWCQETCKCECASEPP R
62	Proteína rica em cisteína	Q70LQ4	54.2	6,2	49.7	1	CDNVNCKCGSSCRCE K CEKGTCTPSCAQTTCCA VNCSKGCCTPK
182	Proteína rica em cisteína	Q70LQ4	21	10	168	1	CEKGECRR
110	Triosephosfato isomerase 1	NP_001090623	32.3	5,8	216	99	DIDGFLVGGASLKP PDFV QIVNAK
111	Triosephosfato	NP_0010	32.1	6,3	166	98	DIDGFLVGGASLKP PDFV

	isomerase 1	90623					QIVNAK
84	Aldolase CG6058-PF, isoforma F	XP_623342	44.5	9,3	180	117	IVPIVEPEILPDGDHDLAR
70	Actina-87E isoforma 1	O96104	51.3	4,8	274	117	SYELPDGQVITIGNER
165	Proteína ribossomal S27A CG5271-PA	ABZ04273	50	10	50.7	110	TITLEVEASDTIENVK

Os spots **4, 5, 7, 53 e 138** foram identificados como **Inibidores de Serino-Proteases**. Isto sugere que os mesmos devem ter papel importante na manutenção das proteinases do veneno em suas formas inativas (TUGMON et al., 1995), durante o armazenamento do veneno (antes da inoculação na vítima de ferroada), prevenindo autólise das toxinas de natureza protéica do próprio veneno. As proteases portanto, devem também ser abundantes no veneno desta espécie de vespa, já que a proteção com inibidores foi comprovada pelo encontro destes no veneno de *Polistes lanio lanio*.

O alérgeno serino-protease tem sido caracterizado nos venenos de Hymenoptera sociais, apresentando atividades catalíticas discretas, e consequentemente, causando necroses associadas às ferroadas desses insetos (SCHMIDT et al., 1980). McNairy et al. (2000), identificaram a presença de serino-protease nos venenos de *Polistes dominulus* e *Polistes exclamans*. Três serino-proteases foram isoladas do veneno de *B.pennsylvanicus* e do veneno das vespas sociais européias (*P.dominulus* e *P.exclamans*), as quais demonstraram um elevado grau de resíduos conservados em suas seqüências primárias (WINNINGHAM et al., 2004). Serino-proteases também foram isoladas e identificadas por Santos (2007) no veneno da vespa *Polybia paulista*.

Os spots **71 e 115** foram identificados como **Proteínas de choque térmico (hsp)**. As proteínas de choque térmico ou proteínas de estresse, também conhecidas como “*Heat Shock Protein*” (HSPs), pertencem ao grupo das Chaperoninas, sendo estas proteínas presentes em quase todos os tipos de células. Sua expressão é induzida quando as células sofrem algum tipo de estresse ambiental e/ou intracelular, como variação de temperatura e/ou privação de oxigênio. Os genes responsáveis pelas proteínas de choque térmico estão em todos os organismos e elas são muito conservadas no que se refere à homologia de seqüências primárias e pesos moleculares. O sequenciamento do genoma da

abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) mostrou a existência das HSPs 40, 70 e 90 como produto de secreção das glândulas de veneno (WEINSTOCK et al., 2006). As HSPs 90 identificadas no veneno da *A. mellifera* estão envolvidas com a tradução de sinais e integração de ligantes, além de atuar nos processos de estresse, enquanto que as HSPs 70 atuam em complexos protéicos juntamente com as HSPs 90 e 40 (VENTER et al., 2001). Outras funções gerais das HSPs no interior das células é a de preparar as células para o descarte de moléculas velhas e/ou de antígenos, e manterem a homeostasia do ambiente celular (MOSELEY, 2002). Quando alguns antígenos são reconhecidos pelas HSPs, elas os conduzem para fora das células, e conseqüentemente, esses antígenos desencadeiam respostas imunes do organismo (HEAT SHOCK PROTEINS: BASICS, 2006). Além disso, a ativação do sistema imune está associada à produção de citosinas mediada pelas HSPs. A exposição da HSP 60 em macrófagos de rato e humano resultou na produção de IL-12 e TNF- α (CHEN et al., 1999; MOSELEY, 2002). Algumas destas proteínas também podem apresentar atividade proteolítica como a HSP65 de *Mycobacterium leprae*, onde estudos de alinhamento genético demonstram sua similaridade com Hs1VU, uma proteinase de *Escherichia coli* (PORTARO et al., 2002). Por outro lado, estudos demonstraram que proteinases do tipo cisteínas foram inibidas pelas CBP2/Hsp47 (SIAVASH et al., 2002). A presença dessas proteínas no veneno da vespa *Polistes lanio lanio* (spots 71 e 115) vem corroborar com os estudos do genoma da abelha *Apis mellifera* (WEINSTOCK et al., 2006) e proteoma do veneno da vespa *Polybia paulista* (SANTOS, 2007), evidenciando a semelhança entre os venenos de vespas e abelhas. Como produto de expressão dos genes no reservatório de veneno, as HSPs podem estar associadas à exposição de alguns componentes celulares à degradação bioquímica, à atividade proteolítica e/ou à ação do sistema imune, ratificando os quadros clínicos de alergia dos pacientes sensibilizados por este veneno. De uma maneira geral, as HSPs 60, 70 e 90 estão envolvidas com atividades de chaperonina, exercendo funções tais como: moldagem de proteínas de forma a manter ou conferir-lhes atividades catalíticas, prevenindo os efeitos da desnaturação térmica, impedindo a formação de agregados moleculares insolúveis e auxiliando na formação correta de pontes dissulfeto. A presença destas proteínas no veneno de vespas pode ainda estar associada a uma estratégia de manter toxinas importantes do veneno na forma inativa, enquanto armazenadas no reservatório, antes da injeção (ferroada) na vítima; sua ação se

exerceria instantes antes da inoculação do veneno, ativando tais proteínas. Trabalhos recentes demonstram que as HSPs possuem atividades de proteção celular, anti- apoptose, regulação de desenvolvimento e transdução-sinal (PEIREN, 2008).

O *spot* **124** foi identificado como sendo uma **superóxido dismutase**. A proteína superóxido dismutase (CuZnSOD) do látex (*Hevea brasiliensis*) apresenta 74% de identidade em sua estrutura tridimensional com o alérgeno Ole 5 de *Olea europaea* (GUARNERI et al., 2006). Esta proteína também foi encontrada no estudo de Santos (2007), onde foi identificada como um possível alérgeno no veneno da vespa social *Polybia paulista* e no estudo de Peiren (2008), onde foram identificadas proteínas da família das superóxido dismutases no veneno de *Apis mellifera*. Neste trabalho de Peiren (2008), estas proteínas foram responsabilizadas pela redução do peróxido de hidrogênio. A presença desta proteína em veneno de vespas e abelhas sugere que as proteínas do tipo superóxido dismutase nos venenos das vespas podem fazer parte das proteínas que desencadeiam processos de ativação de respostas imunes do organismo.

Os *spots* **74, 75, 76 e 77** foram identificados como a proteína **Arginina Quinase**. As proteínas do grupo das Argininas Quinase são enzimas que catalizam a transferência reversível do grupo fósforo do ATP. Proteínas identificadas como Arginina Quinase com alta similaridade de sequências entre si, tem sido encontradas em várias espécies de invertebrados. Os resultados de experimentos de imunoblot identificaram a arginina quinase (40 KDa) como alérgeno presente em mariposas (*D. pteronyssinus*), baratas (*B. germanica*), camarões (*P. monodon*), lagostas (*H. gammarus*), e ostras (*M. edulis*). Porém nenhuma AQ presente no bacalhau, uma espécie de vertebrado, apresentou reação cruzada com as espécies de invertebrados. Isto sugere que a arginina quinase representa uma nova classe de alérgenos de invertebrados, os quais podem implicar na indução e manutenção das atividades respiratórias e alergia alimentar em pacientes sensíveis (BINDER et al, 2001).

O alérgeno Pen m2 foi identificado como uma potente molécula imunoreativa de camarão da espécie *Penaeus monodon* (YU et al., 2003). No entanto, algumas proteínas da vespa social *Polybia paulista* foram identificadas como sendo semelhantes ao alérgeno Pen m2, o qual apresenta sequência peptídica similar à proteína Arginina Quinase de crustáceos (SANTOS, 2007), sugerindo que a

presença de proteínas do tipo Arginina Quinase no veneno de vespas também possam desencadear respostas alérgicas mediadas por IgE-específicas nos acidentes por ferroadas destes insetos.

O *spot 98* foi identificado como um alérgeno que foi isolado anteriormente em ácaros da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* e identificado como Proteína alergênica do grupo 15 (O'NEIL et al, 2006). Esta proteína pode ser, portanto, uma das proteínas presentes no veneno da vespa *Polistes lanio lanio* que causam reações em pacientes alérgicos, agindo de maneira semelhante a seu modo de ação em pacientes que apresentam alergia à poeira. Alérgenos de ácaros *Dermatophagoides farinae*, extraídos de cultura na presença de detergentes foram separados por eletroforese 2D com subsequente immunoblotting (LE MAO, 1998).

Os *spots 62* e *182* foram identificados como proteínas do tipo “**Proteína rica em cisteína**”. A família destas proteínas é um grupo com massa molecular de cerca de 20–30 kDa e com sequência contendo 16 resíduos de cisteína. Esta proteína foi isolada em veneno de serpente, sendo caracterizada por apresentar rápida e eficaz penetração em diferentes tipos de células (KERKIS et al 2004).

Os *spots 110* e *111* foram identificados como a proteína **triosephosphato isomerase**. Esta mesma proteína foi descrita por Hoppe et al (2006) como um dos principais alérgicos presentes no extrato de proteínas provenientes da fruta Lichia. Através do uso de soro proveniente de pacientes alérgicos a esta fruta em ensaios de imunogenicidade, demonstrou-se que a proteína triosephosphato isomerase é um alérgeno presente na fruta reconhecido pelo sistema imune dos pacientes sensíveis em 67% dos casos. Neste trabalho, as proteínas presentes no extrato da fruta foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular, sendo que a identificação da proteína triosephosphato isomerase (28 KDa) foi possível através de sequenciamento N-terminal e Espectrometria de Massas. Essa proteína foi também descrita como um alérgeno de látex (POSH, 1997). Entretanto, esta proteína também pode corresponder a uma enzima presente nas células da glândula secretora de veneno da vespa, que se rompeu liberando parte de seu conteúdo no reservatório de veneno.

As proteínas obtidas através do processamento do veneno de *Polistes lanio lanio* podem estar envolvidas com inflamação e respostas imunológicas. Porém, algumas proteínas do tecido muscular provenientes das glândulas e proteínas citoplasmáticas foram também identificadas, como por exemplo actina (*spot 70*).

Estas proteínas são originadas provavelmente do músculo ou tecidos subjacentes constituintes do reservatório de veneno das vespas dissecadas. Sugere-se que a ruptura de células pode ocorrer no momento em que o aparato de ferroar é removido do inseto com o auxílio de pinças, o que pode causar a mistura das proteínas destas células com as proteínas do veneno bruto. Entretanto, alguns estudos sugerem que proteínas musculares podem induzir respostas imunológicas.

As proteínas **ribossomais (spots 165)**, as **proteínas envolvidas na regulação gênica e metabolismo celular (spots 84 e 70)** são proteínas citoplasmáticas das células da membrana do reservatório do veneno que provavelmente foram extraídas juntamente com a coleta do veneno da vespa em estudo. Apesar de não ser testado o potencial alergênico destas proteínas no presente trabalho, sabe-se que proteínas de músculo, como por exemplo, a tropomiosina, pode provocar quadros de alergia consideráveis (REESE et al., 1999; BARLETTA et al., 2005).

Uma grande similaridade entre as composições dos venenos da abelha *Apis mellifera* e a vespa *Polybia paulista* foi observada por Santos (2007). Fosfolipases, antígeno-5, hialuronidase, proteinases, proteínas de choque térmico (HSPs) desintegrinas, proteínas de veneno II foram algumas proteínas caracterizadas na análise proteômica dos venenos de abelha e da vespa *Polybia paulista* (Santos, 2007). O veneno de *Polistes lanio lanio* apresentou também proteínas similares à estes dois últimos venenos estudados anteriormente. Dessa forma, pôde-se concluir que venenos de vespas e abelhas são muito semelhantes entre si.

O presente estudo é uma Análise Proteômica qualitativa (PLEBANI, 2005), na qual se identificou as proteínas mais abundantes do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio*, a fim de compreender os mecanismos de ação dessas proteínas, quando um indivíduo alérgico é sensibilizado após um acidente por ferroadinha dessa vespa. Os trechos de seqüências primárias obtidas nesse estudo foram utilizados para identificação das proteínas de interesse, com o auxílio de ferramentas de alinhamento de seqüências primárias, frente às informações contidas nos bancos de proteínas. Porém, como o genoma da vespa social *P. lanio lanio* não foi caracterizado ainda, as identificações das proteínas ocorreram comparando-se as seqüências obtidas no estudo com as seqüências parciais de proteínas e/ou com os bancos de dados de genomas completos de organismos mais próximos filogeneticamente.

A presença abundante de proteínas do tipo Arginina Quinase no veneno da vespa *P. lanio lanio*, fez com que surgisse um grande interesse sobre esta proteína, a qual foi detectada em quatro spots diferentes no gel de poliacrilamida 15%, sendo estes spots os mais abundantes no veneno da vespa estudada. Devido à curiosidade e tentativa de aprofundamento no conhecimento sobre os mecanismos de ação deste veneno, realizou-se a caracterização molecular destas proteínas.

A Figura 3 mostra o perfil protéico do veneno bruto da vespa em estudo, onde essas isoformas de AQ estão enumeradas conforme a análise proteômica realizada anteriormente.

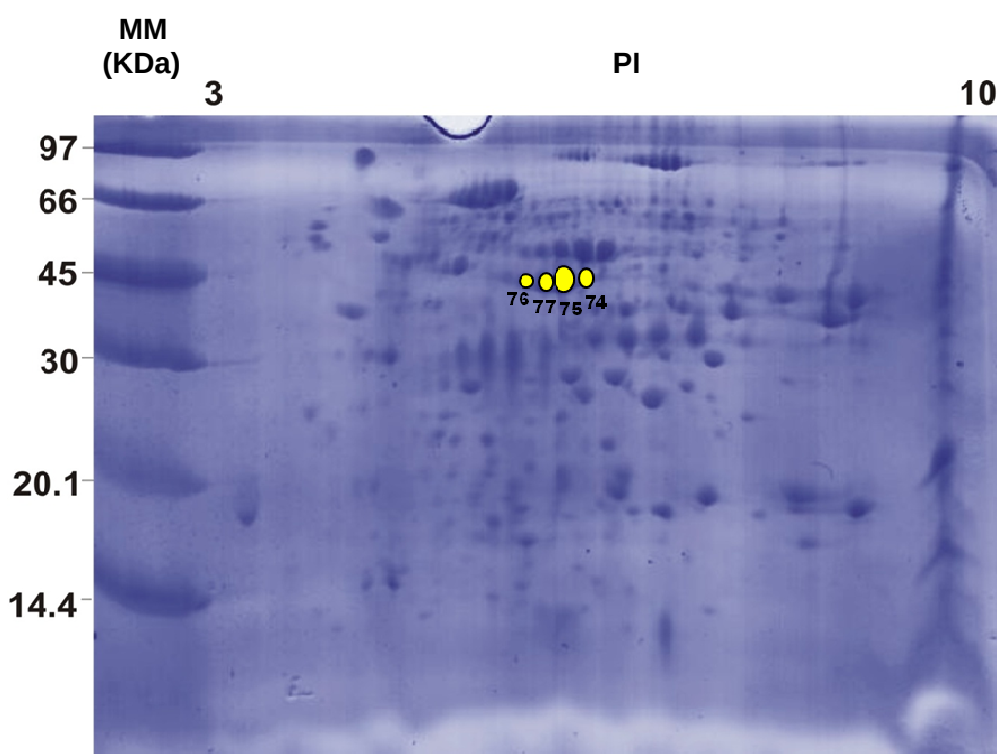


FIGURA 3: Gel de Eletroforese Bidimensional em SDS-PAGE 15% (m/v) do veneno da vespa social *P. lanio lanio*. As proteínas foram focalizadas em fitas de pI de 3 a 10, com 7 cm de comprimento. Aproximadamente, 171 proteínas foram detectadas pela coloração com CBB. Os spots rachurados em amarelo são as isoformas da proteína Arginina Quinase identificados pela análise proteômica do veneno bruto da vespa.

Conforme a análise proteômica do veneno bruto da vespa *P. lanio lanio* realizada anteriormente, as proteínas identificadas foram excisadas do gel, descoradas e submetidas à digestão com a utilização de dois tipos diferentes de enzimas: tripsina e quimiotripsina. Os fragmentos peptídicos foram submetidos às análises de espectrometria de massas, e com o auxílio de ferramentas de

bioinformática, as proteínas foram identificadas e caracterizadas. Dentre elas, 4 proteínas foram caracterizadas como Arginina Quinase (*spots* 74, 75, 76 e 77). As Tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram dados de espectrometria de massas dessas isoformas de AQ com suas respectivas sequências parciais, íon escore e escores de identificação. Estas sequências foram submetidas à identificação através de ferramentas de bioinformática ora utilizando taxonomia aberta ora taxonomia *Apis mellifera*, já que na ferramenta de bioinformática (MASCOT) utilizada é possível a escolha de alguma espécie específica ou abranger todas as espécies de organismos.

TABELA 2: Sequências peptídicas obtidas por espectrometria de massas tandem presentes na digestão trípica do *spot* 74.

Sequência	Íon Score	Score	Banco <i>Apis mellifera</i>	Banco Geral
IISMQMGGDLGQVYR	60	36,2	Arginina Quinase	Arginina Quinase
TFLVWCNEEDHLR	83	36,2	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FGFLTFCPTNLGTTVR	92	38,5	Arginina Quinase	Arginina Quinase
DFGDVDSLGNLDPAGEFIVSTR	184	46,6	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FLQAANACRFWPTGR	-	40,8	Arginina Quinase	Arginina Quinase
EIQQKLIDDHFLFK	-	30	Arginina Quinase	Arginina Quinase
GTFYPLTGMSKEIQQK	-	35,4	Arginina Quinase	Arginina Quinase
SLEGYPFNPCLTEAQYK	-	43,1	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FWPTGRGIYHNDK	-	37	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FWPTGRGIFHNDAKT	-	37,4	Arginina Quinase	Arginina Quinase

TABELA 3: Sequências peptídicas obtidas por espectrometria de massas tandem presentes na digestão trípica do *spot* 75.

Sequência	Íon Score	Score	Banco <i>Apis mellifera</i>	Banco Geral
IISMQMGGDLGQVYR	57	36,2	Arginina Quinase	Arginina Quinase
TFLVWCNEEDHLR	97	36,2	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FGFLTFCPTNLGTTVR	90	38,5	Arginina Quinase	Arginina Quinase
DFGDVDSLGNLDPAGEFIVSTR	171	38,5	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FLQAANACRFWPTGR	-	40,8	Arginina Quinase	Arginina Quinase

LEEASKFNLQVRGTR	-	32,7	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FWPTGRGIYHNDK	-	37	Arginina Quinase	Arginina Quinase
SLEGYPFNPCLTEAQYK	-	43,1	Arginina Quinase	Arginina Quinase

TABELA 4: Sequências peptídicas obtidas por espectrometria de massas tandem presentes na digestão triptica do *spot* 76.

Sequência	Íon Score	Score	Banco <i>Apis mellifera</i>	Banco Geral
EVFDQLK	27	-	Arginina Quinase	Arginina Quinase
DFGDVDSLGNLDPAGEFIVSTR	169	-	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FWPTGRGIYHNDK	--	37	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FLQAANACRFWPTGR	-	40,8	Arginina Quinase	Arginina Quinase

TABELA 5: Sequências peptídicas obtidas por espectrometria de massas tandem presentes na digestão triptica do *spot* 77.

Sequência	Íon Score	Score	Banco <i>Apis mellifera</i>	Banco Geral
LPFSHNDR	57	-	Arginina Quinase	Arginina Quinase
LIDHFLFK	25	-	Arginina Quinase	Arginina Quinase
IISMQMGGDLGQVYR	61	36,2	Arginina Quinase	Arginina Quinase
TFLVWCNEEDHLR	88	36,2	Arginina Quinase	Arginina Quinase
DFGDVDSLGNLDPAGEFIVSTR	158	46,2	Arginina Quinase	Arginina Quinase
GTFYPLTGMSK	-	28,5	Arginina Quinase	Arginina Quinase
AKLEEVAAKFNLQVR	-	30,8	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FLQAANACRFWPTGR	-	40,8	Arginina Quinase	Arginina Quinase
LEEVAAKFNLQVRGTR	-	33,1	Arginina Quinase	Arginina Quinase
GEHTEAEGGIYDISNKR	-	38,1	Arginina Quinase	Arginina Quinase
SLDGYPFNPCLTEAQYK	-	46,1	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FGFLTFCPTNLGTTVR	61	38,5	Arginina Quinase	Arginina Quinase
IPFSHNDR	57	-		Arginina Quinase
LISMQMGGDLGQVYR	61	35	Arginina Quinase	Arginina Quinase
FWPTGRGIYHNDK		37	Arginina Quinase	Arginina Quinase

Pode-se perceber que os quatro spots apresentaram sequências peptídicas identificadas como a proteína Arginina Quinase, tanto para o banco geral quanto para o banco de *Apis mellifera*. Após esta identificação, juntou-se e alinhou-se os fragmentos peptídicos conseguidos anteriormente para cada *spot*, para que fosse possível uma busca mais completa nos bancos de dados. As identificações resultantes destas pesquisas para cada *spot* em particular encontram-se na tabela 6:

TABELA 6: Caracterização molecular das isoformas de AQ presentes no veneno da vespa social *P. lanio lanio*. As sequências parciais foram obtidas pela digestão triptica dos *spots* recortados do gel de eletroforese bidimensional do veneno bruto da vespa em estudo, sendo

que os peptídeos resultantes foram detectados por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS e seqüenciados por espectrometria de massas MS/MS.

Spot:	Identificação	Código de Acesso	MM (kDa)	pI	Mascot Score	Total Ion Score
74	arginine kinase	A8VVY3	48.9	5.9	198	184
75	arginine kinase	ABH04187	48.2	5.7	189	171
76	arginine kinase	A5JDM1	47.6	5.4	207	169
77	arginine kinase-like protein	A5HUI6	47.3	5.6	271	88

Após o sequenciamento dos fragmentos peptídicos obtidos pela clivagem com tripsina, juntando-se os fragmentos obtidos, foi possível determinar a sequência primária completa das isoformas da AQ do veneno da vespa *P. lanio lanio* por espectrometria de massas MS/MS. Observou-se, porém, que a sequência obtida com a digestão do spot 76 era igual à sequência do spot 74, representando portanto na mesma proteína. As sequências completas estão demonstradas nas figuras 4, 5, e 6:



Figura 4: Sequência primária completa da isoforma AQ, presente no **spot 74**, do veneno da vespa social *P. lanio lanio* obtida por espectrometria de massas MS/MS.



Figura 5: Sequência primária completa da isoforma AQ, presente no **spot 75**, do veneno da vespa social *P. lanio lanio* obtida por espectrometria de massas MS/MS.

```
MVDAATLEKLEAGFKKLEASDSKSLKKYLSKEVFDQLKTKDFGDVD
SLGNLDPAGEFIVSTRVRCGRSLDGYPFNPCLTEAQYKEMEELKVSSTL
SGLEGELKGTFFYPLTGMSKEIQQLIDHFLFKEGDRFLQAANACRF
WPTGRGIYHNDKTFVLVWCNEEDHLRIISMQMGGDLGQVYRLPFSHN
DRGFLTFCPTNLGTTVRASVHIKLPKLAANRAKLEEVAAKFNLQVRGT
RGEHTEAEGGIYDISNKRLGLTEYQAVKEMNDGIAELIKIER
```

Figura 6: Sequência primária completa da isoforma AQ, presente no **spot 77**, do veneno da vespa social *P. lanio lanio* obtida por espectrometria de massas MS/MS.

Como o genoma da vespa social *P. lanio lanio* não foi caracterizado ainda, as identificações das argininas quinases ocorreram comparando-se as sequências obtidas neste estudo com as sequências parciais de proteínas e/ou com os dados dos bancos de dados de genomas completos de organismos mais próximos filogeneticamente. As isoformas de AQ, através de pesquisas nos bancos de dados, demonstraram alta semelhança com o alérgeno arginina quinase encontrado em músculo do caranguejo *Limulus polyphemus* (PDB:1RL9) (AZZI et al, 2004). Assim, na figura 7, podemos analisar o alinhamento das sequências primárias das isoformas de AQ do veneno da vespa *P. lanio lanio*, em comparação com a AQ de caranguejo (PDB:1RL9). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et. al., 1994) e editadas no programa JALVIEW (CLAMP et. al, 2004).

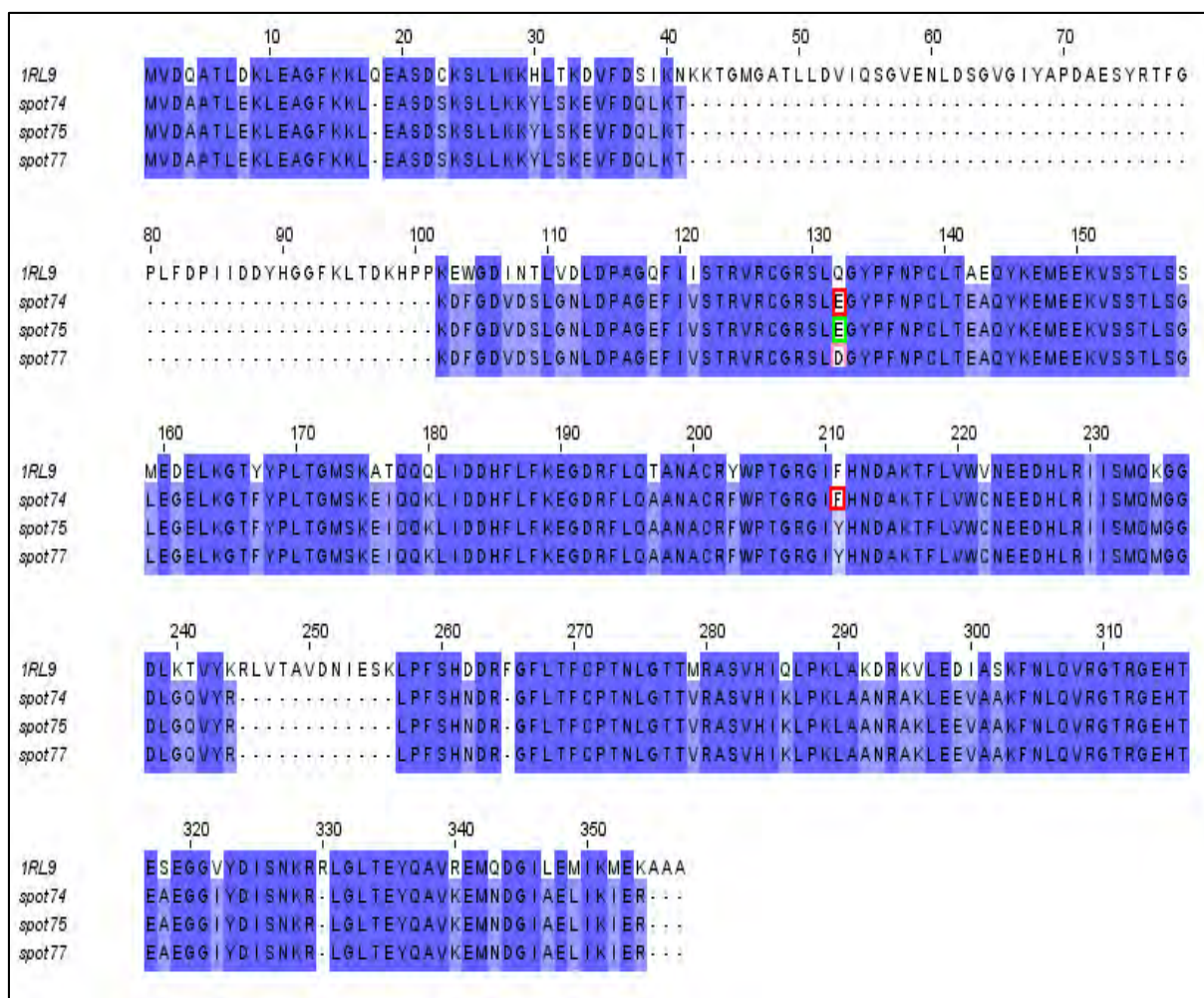


Figura 7: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária das isoformas da Arginina Quinase provenientes do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* com a sequência primária do alérgeno AQ do músculo de caranguejo (PDB: 1RL9). As regiões de identidade mais importantes estão assinaladas em azul escuro, enfatizando os resíduos altamente conservados nesse tipo de alinhamento. As regiões coloridas representam os resíduos de aminoácidos que modificaram nas sequências, caracterizando as isoformas. As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W (Thompson et. Al., 1994) e editadas no programa JALVIEW (CLAMP et. al, 2004).

No presente estudo, as sequências de AQ foram referidas como isoformas pelo fato de apresentarem diferenças em alguns resíduos de aminoácidos nas sequências. Estes resíduos que diferem uma isoforma da outra estão marcados em quadrados coloridos na figura 7. Acredita-se que a presença de isoformas seja uma forma do organismo em estudo contornar o sistema imunológico de suas vítimas. Segundo Santos (2007), trata-se de um processo natural, visando gerar formas moleculares imunoreativas e não imunoreativas e talvez até direcionadas a diferentes destinos celulares.

Pode-se observar na figura 7, que os resíduos assinalados em azul escuro são os resíduos de aminoácidos que se conservam em todas as sequências primárias de AQ que foram alinhadas, ou seja, são os resíduos de aminoácidos idênticos em todas as sequências estudadas. Os resíduos assinalados em azul claro são os resíduos de aminoácidos que apresentam propriedades físico-químicas similares. Na tabela, podemos comparar os valores de identidade e similaridade entre as sequências primária do alérgeno AQ da espécie *Limulus polyphemus* (PDB:1RL9) com as isoformas de AQ encontradas no veneno da vespa social *Polistes lanio lanio*.

Utilizando-se do alinhamento das sequências primárias das AQ já descritas na literatura, foi possível escolher um molde (*template*) para realizar a modelagem da estrutura tridimensional da AQ do veneno da vespa social *P. lanio lanio*. O molde escolhido foi o do caranguejo *Limulus polyphemus* (PDB:1RL9) de 40893,76 Da, resolvida por cristalografia de raio X a uma resolução de 3.0 Å (AZZI et al,2004).

O molde apresenta uma identidade de 75% e uma similaridade de 86% com as sequências primárias das proteínas em estudo, isto indica que a estrutura tridimensional escolhida é um bom molde, pois a precisão na modelagem molecular por homologia de proteínas está relacionada à porcentagem de identidade na qual o modelo é baseado, estabelecendo uma correlação entre a similaridade estrutural e sequencial das duas proteínas (SANCHEZ et al., 1998; KOEHL, 1999; MARTIRENOM et al., 2000).

Foram gerados 1000 modelos para cada isoforma de proteína Arginina Quinase do veneno da vespa social *P. lanio lanio* e a escolha do melhor modelo foi baseada na qualidade estereoquímica utilizando o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al. 1993), e a função objetiva do MODELLER (SALI et al., 1993). A imagem da estrutura tridimensional dos modelos foi gerada a partir do programa PyMOL (DELANO, 2002 - <http://www.pymol.org>) e está ilustrada nas figuras 8, 9 e 10,:

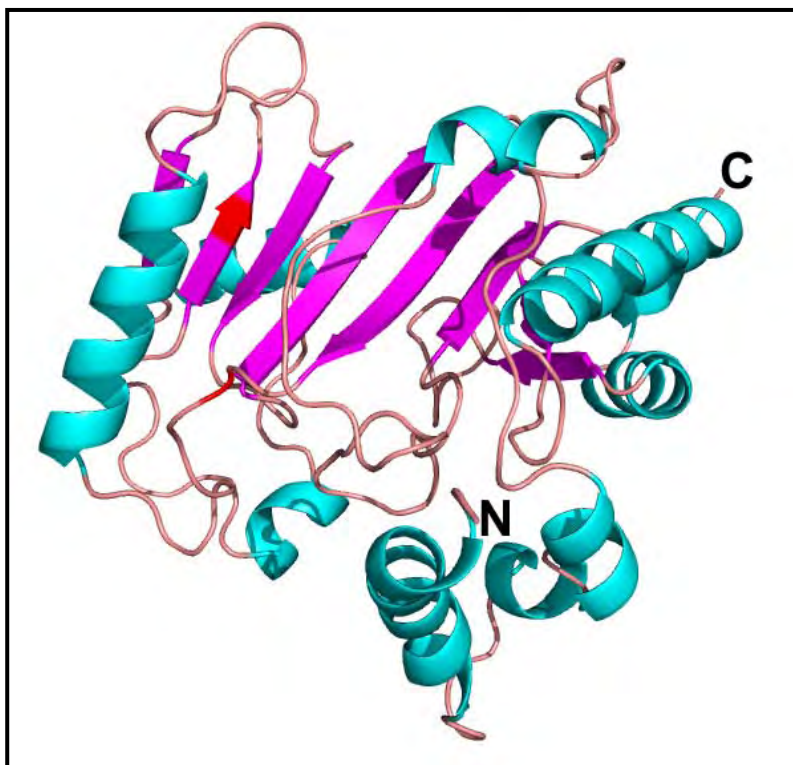


Figura 8: Modelo teórico da estrutura tridimensional da isoforma alérgeno AQ do spot 74 do veneno da vespa social *P. lanio lanio* gerado a partir do programa PyMOL (DELANO, 2002).

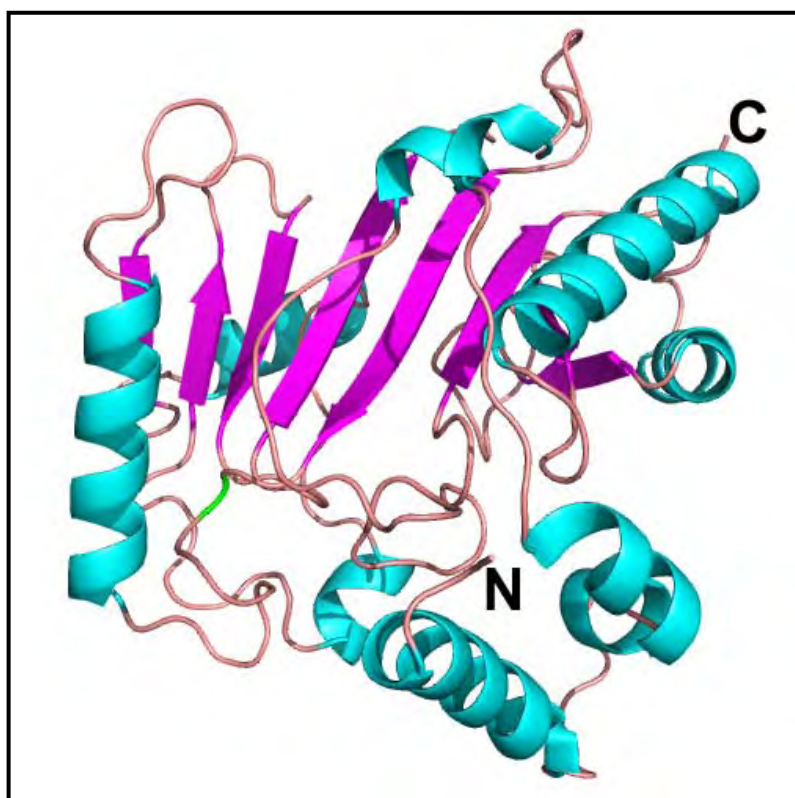


Figura 9: Modelo teórico da estrutura tridimensional da isoforma alérgeno AQ do spot 75 do veneno da vespa social *P. lanio lanio* gerado a partir do programa PyMOL (DELANO, 2002).

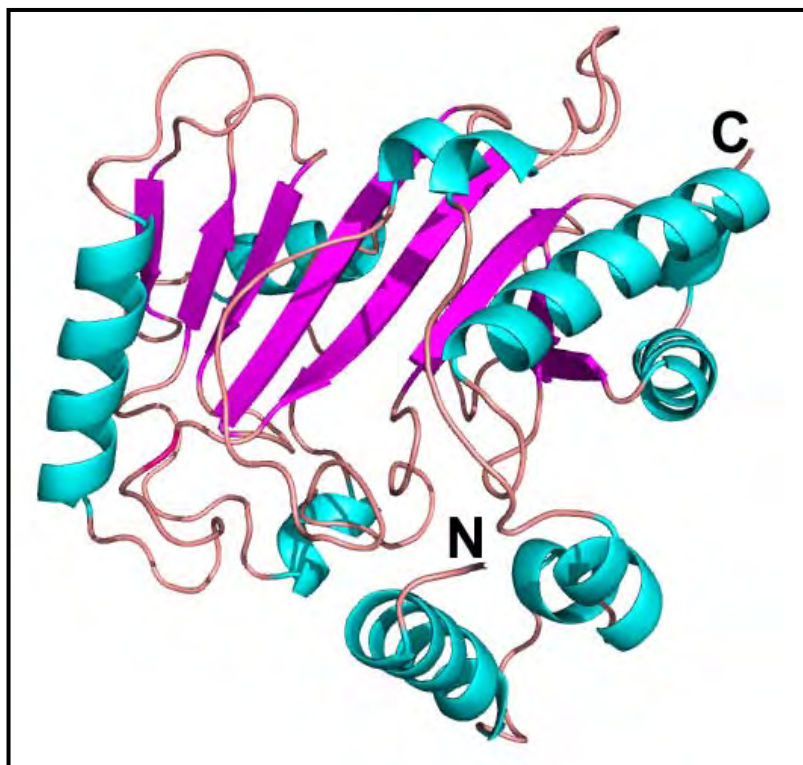


Figura 10: Modelo teórico da estrutura tridimensional da isoforma alérgeno AQ do spot 77 do veneno da vespa social *P. lanio lanio* gerado a partir do programa PyMOL (DELANO, 2002).

Avaliar a qualidade do modelo é fundamental, pois ela será proporcional à qualidade da estrutura tridimensional utilizada como molde (SANCHEZ et al., 1998). Assim, deve-se avaliar o modelo, como um todo, e, por região. Diversas metodologias existem para a avaliação da qualidade de uma estrutura, seja ela determinada experimentalmente ou por modelagem por homologia.

Após a escolha do melhor modelo, análises mais criteriosas e detalhadas foram efetuadas com a utilização do PROCHECK, VERIFY 3D, RMSD da geometria ideal e RMSD da sobreposição, a fim de verificar a qualidade do modelo construído.

O programa PROCHECK foi utilizado para analisar a geometria global dos modelos através do Diagrama de Ramachandran (apresenta os ângulos de ligação phi (ϕ) e psi (ψ) da cadeia principal, tais ângulos são referentes às ligações Ca-N e Ca-C) e o G-fator (verifica os ângulos de ligação e a geometria covalente da proteína toda).

Segundo Ramachandran (RAMACHANDRAN et al., 1963), uma estrutura de boa qualidade deve ter 90% ou mais de seus resíduos nas regiões mais favoráveis. As áreas em branco correspondem a regiões onde existem os choques

estereoquímicos na proteína. Estas regiões não permitidas estereoquimicamente valem para todos os aminoácidos exceto a glicina (Gly) que é a única que não tem cadeia lateral e pode adotar os ângulos de torção ϕ e ψ em todos os quadrantes do diagrama de Ramachandran. As áreas vermelhas correspondem à conformação onde não há nenhum choque estereoquímico, ou seja, são as regiões permitidas e aonde se encontram as hélices- α e folhas- β . As áreas em amarelo escuro e claro mostram regiões limitantes, porém ainda ângulos permitidos ou generosamente permitidos, respectivamente.

Os Diagramas de Ramachandran dos spots 74, 75 e 77 estão representados nas figuras 11, 12 e 13, respectivamente:

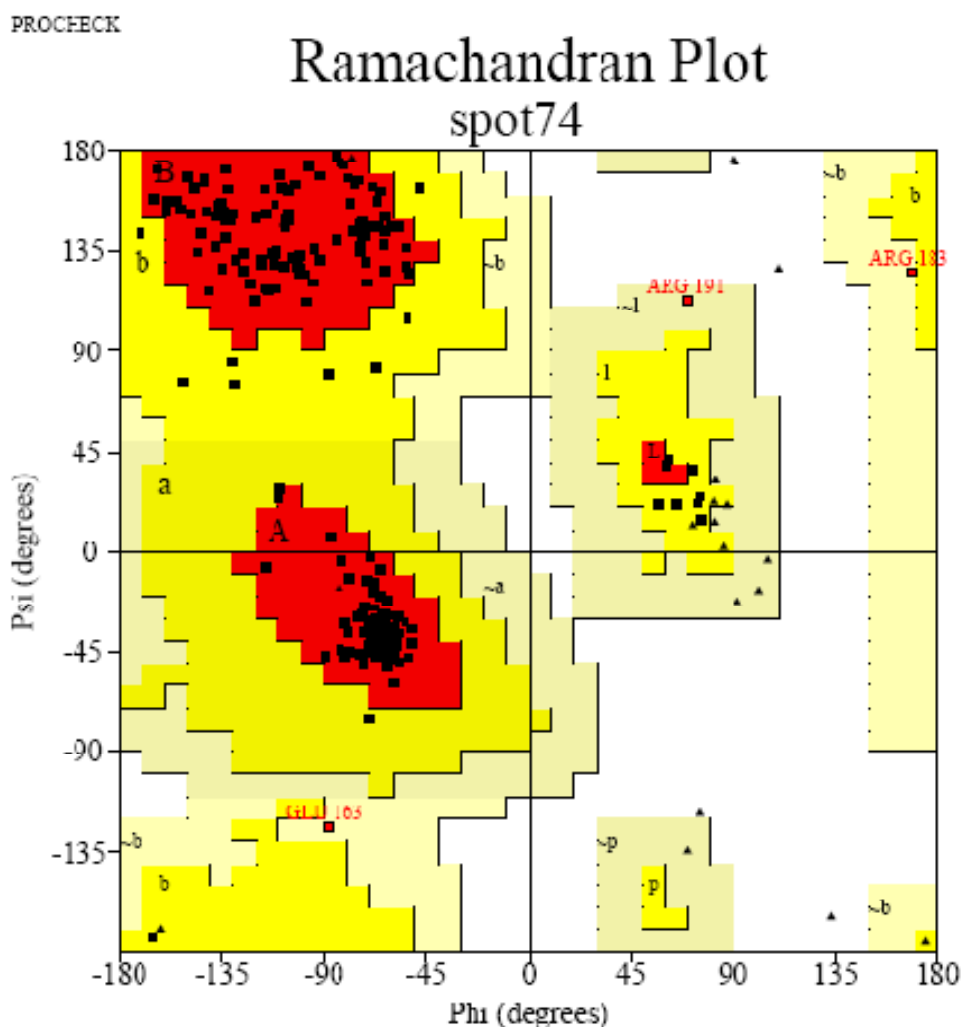


Figura 11: Avaliação da qualidade da estrutura tridimensional da isoforma de arginina quinase proveniente do spot 74 do veneno da vespa social *P. lanio lanio* através do Diagrama de Ramachandran.

De acordo com o diagrama de Ramachandran da isoforma 74 de AQ, ilustrado na figura 11, 224 resíduos de aminoácidos (91,4%) do modelo teórico estão localizados nas regiões favoráveis do gráfico (regiões em vermelho), 18 resíduos (7,3%) estão localizados nas regiões adicionalmente permitidas (regiões em amarelo escuro), 3 resíduos (1,2%) estão localizados na região generosamente permitida (regiões em amarelo claro) e nenhum resíduo está localizado na região não permitida do gráfico (regiões em branco).

Como um bom modelo deve apresentar mais que 90% de resíduos nas regiões mais favoráveis, o presente modelo possui uma ótima qualidade estereoquímica. Dentre os 34 resíduos que faltam para totalizar os 279 resíduos de aminoácidos que constituem a seqüência, 24 são resíduos de glicina que não são considerados por terem liberdade de se localizarem em qualquer região do diagrama de Ramachandran, 8 resíduos de prolina e 2 resíduos que são os ultimos da seqüência ao qual o Procheck não considera quando gera o Gráfico de Ramachandran.

PROCHECK

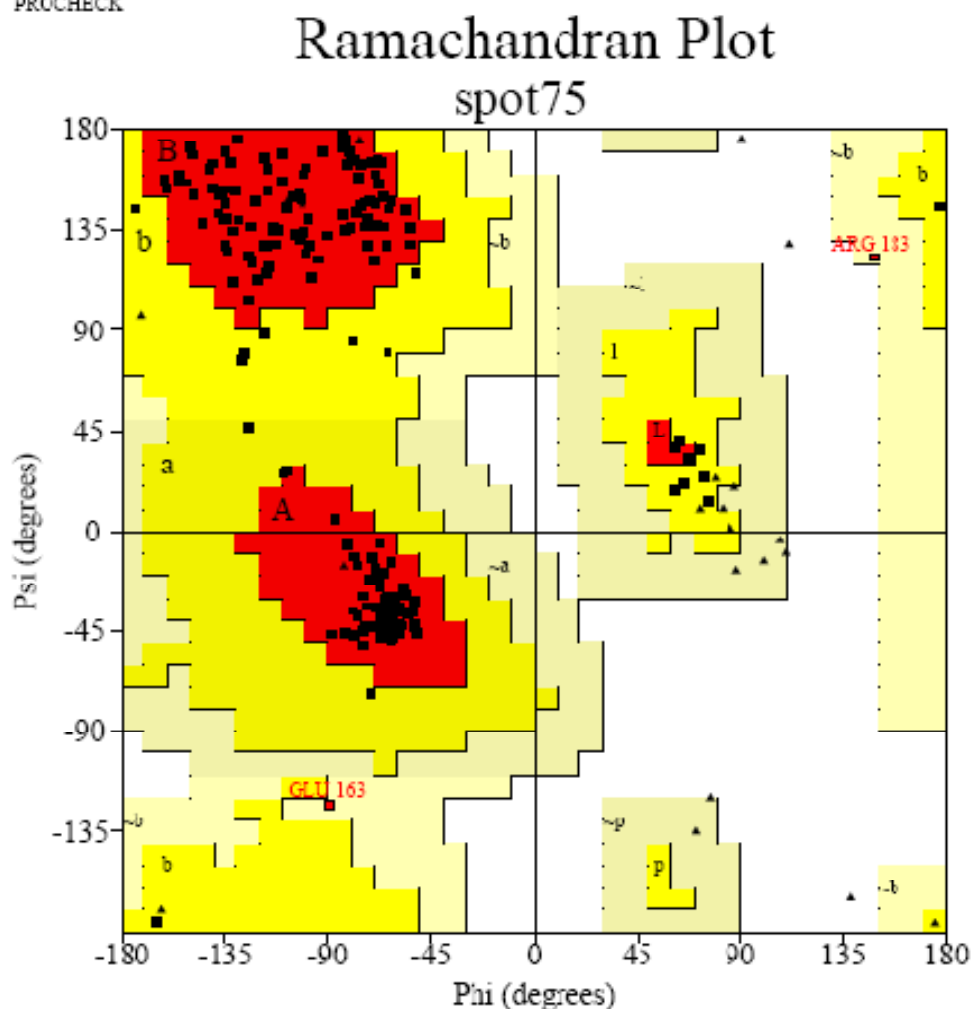


Figura 12: Avaliação da qualidade da estrutura tridimensional da isoforma de arginina quinase proveniente do spot 75 do veneno da vespa social *P. lanio lanio* através do Diagrama de Ramachandran.

De acordo com o diagrama de Ramachandran da isoforma 75 de AQ, ilustrado na figura 12, 226 resíduos de aminoácidos (92,2%) do modelo teórico estão localizados nas regiões favoráveis do gráfico (regiões em vermelho), 17 resíduos (6,9%) estão localizados nas regiões adicionalmente permitidas (regiões em amarelo escuro), 2 resíduos (0,8%) estão localizados na região generosamente permitida (regiões em amarelo claro) e nenhum resíduo está localizado na região não permitida do gráfico (regiões em branco).

Como um bom modelo deve apresentar mais que 90% de resíduos nas regiões mais favoráveis, o presente modelo possui uma ótima qualidade estereoquímica. Dentre os 32 resíduos que faltam para totalizar os 279 resíduos de aminoácidos que constituem a sequência, 24 são resíduos de glicina que não são considerados por terem liberdade de se localizarem em qualquer região do diagrama

de Ramachandran, 8 resíduos de prolina e 2 resíduos que são os últimos da sequência ao qual o Procheck não considera quando gera o Gráfico de Ramachandran.

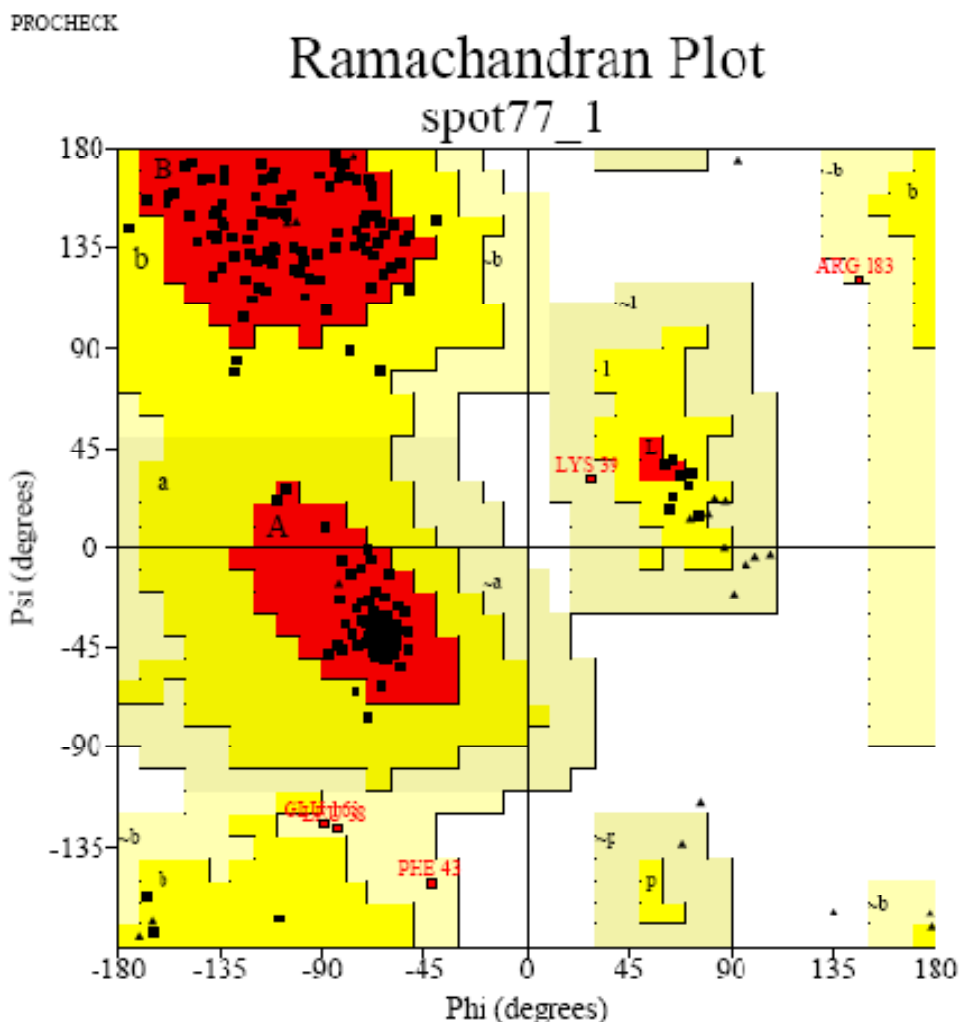


Figura 13: Avaliação da qualidade da estrutura tridimensional da isoforma de arginina quinase proveniente do *spot 77* do veneno da vespa social *P. lanio lanio* através do Diagrama de Ramachandran.

De acordo com o diagrama de Ramachandran da isoforma 77 de AQ, ilustrado na figura 13, 222 resíduos de aminoácidos (90,6%) do modelo teórico estão localizados nas regiões favoráveis do gráfico (regiões em vermelho), 18 resíduos (7,3%) estão localizados nas regiões adicionalmente permitidas (regiões em amarelo escuro), 5 resíduos (2%) estão localizados na região generosamente permitida (regiões em amarelo claro) e nenhum resíduo está localizado na região não permitida do gráfico (regiões em branco).

Como um bom modelo deve apresentar mais que 90% de resíduos nas regiões mais favoráveis, o presente modelo possui uma ótima qualidade

estereoquímica. Dentre os 34 resíduos que faltam para totalizar os 279 resíduos de aminoácidos que constituem a seqüência, 24 são resíduos de glicina que não são considerados por terem liberdade de se localizarem em qualquer região do diagrama de Ramachandran, 8 resíduos de prolina e 2 resíduos que são os últimos da seqüência ao qual o Procheck não considera quando gera o Gráfico de Ramachandran.

O G-factor global é uma medida da qualidade estereoquímica da estrutura como um todo. O G-factor médio dos ângulos de torção e geometria covalente representa uma medida do desvio de uma dada propriedade estereoquímica para cada resíduo de aminoácido da estrutura. O valor ideal deste fator deve ser acima de -0,5. Valores no intervalo de -0,5 a -1,0 determinam a existência de resíduos na proteína que devem ser investigados e, valores abaixo de -1,0, indicam que os modelos apresentam qualidade estereoquímica ruim e devem ser investigados. O G-factor global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula, pois representa a média de todos os G-factor obtidos para cada aminoácido da estrutura. Os resultados dos valores do G-factor médio para os ângulos de torção, geometria covalente e para o G-factor global da isoforma dos *spots* 74, 75 e 77 estão demonstrados nas tabela 7.

Tabela 7: Resultado dos valores do G-factor do modelo da estrutura tridimensional das isoformas de arginina quinase do veneno da vespa social *P. lanio lanio*.

Isoforma (<i>spot</i>)	Angulo de Torção	Geometria Covalente	Média Global
74	- 0,09	- 0,79	- 0,34
75	- 0,05	- 0,74	- 0,31
77	- 0,06	- 0,77	- 0,32

Os valores obtidos para o G-factor médio e global indica que os modelos teóricos das isoformas de arginina quinase do veneno da vespa *P. lanio lanio* possuem boa qualidade estereoquímica e compatível com o do molde utilizado.

Para verificar a confiabilidade na compatibilidade entre a seqüência primária e a estrutura tridimensional do modelo teórico da hialuronidase foi utilizado o programa VERIFY 3D. Os valores obtidos para as quatro isoformas de arginina quinase estão na tabela 8.

Tabela 8: Resultado da avaliação do programa VERIFY 3D dos modelos das estruturas tridimensionais das isoformas de arginina quinase do veneno da vespa social *P. lanio lanio*.

Isoforma (spot)	Valor obtido
74	87.86%
75	93.93%
77	78.93%

Os valores obtidos nesta última análise indicam que a estrutura dos modelos teóricos possuem compatibilidade entre a sequência primária do modelo e a estrutura tridimensional obtida, pois os valores gerados para os modelos estão acima do limite de 45%.

Para analisar o desvio médio da posição dos átomos de uma estrutura em relação aos parâmetros observados por Engh et al. (1991), calculou-se o desvio médio quadrático (RMSD) da geometria ideal.

O valor do RMSD da geometria ideal para o comprimento e ângulo de ligação foi calculado através do programa X-PLOR, que gera um arquivo com os valores do RMSD para as ligações e ângulos diedros e impróprios bem como contatos não ligados. Valores ideais para o comprimento e ângulo de ligação devem estar abaixo de 0,06 Å e 10,0°, respectivamente, para que a geometria da proteína como um todo esteja em equilíbrio. Os valores obtidos nesta análise encontram-se na tabela 9:

Tabela 9: Valores do RMSD da geometria ideal para o comprimento e ângulo de ligação dos modelos das estruturas tridimensionais das isoformas de arginina quinase do veneno da vespa social *P. lanio lanio*.

Isoforma (spot)	Comprimento de Ligação (angstrom)	Ângulos de Ligação (°)
74	0.022	2.591
75	0.022	2.550
77	0.022	2.551

Os valores obtidos para o comprimento de ligação e ângulo de ligação dos modelos teóricos indicam que as geometrias das estruturas tridimensionais das isoformas de arginina quinase estão em equilíbrio.

Os resultados de análise dos modelos estruturais tridimensionais das isoformas de arginina quinase do veneno da vespa social *P. lanio lanio* mostraram que os mesmos possuem uma boa qualidade estrutural. Este estudo proporcionou

um conhecimento mais aprofundado e específico das isoformas de arginina quinase encontradas no veneno estudado, possibilitando melhor compreensão dos mecanismos de ação do veneno da espécie de vespa *Polistes lanio lanio*.

6. CONCLUSÃO

A identificação de várias proteínas do veneno de *P. l. lanio*, revelou importantes aspectos sobre o processo de envenenamento por vespas do gênero *Polistes*, os quais podem ajudar no melhor entendimento dos mecanismos de ação destes venenos. A compreensão dos principais alérgenos é uma etapa importante para o desenvolvimento de novos extratos específicos para diagnósticos de alergia e imunoterapia de pacientes sensíveis ao veneno de vespas.

A Igumas proteínas como as HSPs, superóxido dismutase e arginina quinase já foram identificadas em outros venenos de himenópteros, demonstrando assim, uma certa similaridade entre os venenos, porém os perfis protéicos dos estudos de diferentes espécies de insetos foram muito diferentes do perfil protéico apresentado neste trabalho realizado, demonstrando que as quantidades e tipos de proteínas variam entre as espécies.

A caracterização molecular das proteínas mais abundantes nos venenos das vespas sociais predominantes no Sudeste do Brasil é importante, uma vez que, diversos casos de reações alérgicas e anafiláticas são documentados frequentemente. A fim de auxiliar o desenvolvimento de extratos mais específicos e sensíveis para diagnóstico e tratamento de pacientes hipersensíveis aos venenos de vespas brasileiras e um melhor entendimento dos mecanismos de ações desse veneno, o estudo das principais proteínas do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* do estudo foi realizado com êxito.

No presente estudo, o isolamento e a caracterização molecular da proteína Arginina Quinase do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* nos proporciona a possibilidade de uma investigação precisa e uma melhor compreensão da relação estrutura/atividade biológica deste alérgeno, já que esta proteína foi identificada como um alérgeno presente no veneno da vespa social *Polybia paulista* e também como um alérgeno presente em camarão. Esta observação levanta uma questão para ser investigada no futuro: poderia ocorrer reação cruzada entre o veneno das vespas e alimentos como camarão?

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRE, R. D. Social Wasps. In: Hermann, H. V. R. (ed). **Social Insects**. New York, Academic Press. p.1-105, 1982.

ALLEN, F. H. et al. The Cambridge Crystallographic Data Centre: computer-based search, retrieval, analysis and display of information. **Acta Crystallographica**, v. B35, p. 2331- 2339, 1979.

ANTONICELLI, L.; BILO, M.B. BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera Allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, London, v.2, p.341-346, 2002.

ANTONUCCI, F.; CHILOSI, M.; PAROLINI, C.; HAMDAN, M.; ASTNER, H.; RIGHETTI, P.G. Two-dimensional molecular profiling of mantle cell lymphoma. **Electrophoresis**, Germany ,v.24, p.2376-2385, 2003.

AZZI, A.; CLARK, S.A.; ELLINGTON, W.R.; CHAPMAN, M.S. The role of phosphagen specificity loops in arginine kinase. **Protein Sci.**, vol.13, p. 575-585, 2004.

BARLETTA, B.; BUTTERONI, C.; PUGGIONI, E. M. R.; IACOVACCI, P.; AFFERNI, C.; TINGHINO, R.; ARIANOW, R.; PANZANIZ, R.C.; PINI, C.; DI FELICE, G. Immunological characterization of a recombinant tropomyosin from a new indoor source, *Lepisma saccharina*. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v.35, p.483–489, 2005.

BARLOW, D.J.; EDWARDS, J.M.; THORTON, J.M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**, New York, v.322, p.747-748, 1986.

BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro, EPUB, cap. 63, p. 97-105, 1994.

BECK, H.C.; NIELSEN, E.C.; MATTHIESEN, R.; JENSEN, L.H.; SEHESTED, M.; FINN, P.; GRAUSLUND, M.; HANSEN, A.M.; JENSEN, O.N. Quantitative proteomic analysis of post-translational modifications of human histones. **Molecular & Cellular Proteomics**, United States, v. 5, p.1314-1325, 2006.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank, **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.

BETTIN S. Arthropod Venom, **Springer-Verlag**, New York, 1978.

BINDER M, MAHLER V, HAYEK B, SPERR WR, SCHOLLER M, PROZELL S. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from indian meal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. **J Immunol**. v.167, p.5470–5477, 2001.

BOURNE, P.E.; WEISSIG, H. **Structural Bioinformatics Wiley-Liss**; p. 509-524, 2003.

BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, p. 164-170, 1991.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BRADSHAW R. A.; BURLINGAME A.L. From Proteins to Proteomics, **IUBMB Life**, v.57, p. 267 – 272, 2005.

BRANDÃO C.R.F. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, 4: invertebrados de água doce**/Deborah

Ismael; Wagner Cotroni Valenti; Takako Matsumura-Tundisi; Odete Rocha; Cap.15 - São Paulo: FAPESP, 1999.

BROTHERS, D. J. Phylogeny and Classification of the Aculeate Hymenoptera, With Special reference to Mutilidae. **Scien. Bull. Univ. Kansas**, v. 50 (11), p. 483-648, 1975.

BRUNGER, A. T. **X-PLOR a system for X-ray Crystallography and NMR**. New Haven: Yale University Press, 1992.

CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N.; MALASPINA, O. **Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas**. In Venenos animais: Uma visão integrada. Editora de Publicações Científicas Ltda, Rio de Janeiro, p.173-193, 1994.

CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMANN, K.; BURKART, V.; KOLB, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. **J. Immunol.**, Baltimore, v.162, p.3212-3219, 1999.

CLAMP, M.; CUFF, J.; SEARLE, S. M.; BARTON, G. J. The Jalview Java Alignment Editor, **Bioinformatics**, v. 20, p. 426-427, 2004.

DALY, H.V.; DOYEN, J. T.; PURCELL III, A.H.. **Introduction to insect Biology and diversity**. New york, Editora Oxford University Press, II+680p,1998.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific**, Palo Alto, CA, USA., 2002.

DE LIMA, P.R.M.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on Apis mellifera. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. Vol 9, no.2, p. 149-162, 2003.

DE LIMA, T. **Algoritmos evolutivos para predição de estruturas de proteínas**. São Carlos, 2006. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de computação e Matemática Computacional) - Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação,

Universidade de São Paulo.

DOTIMAS, E. M.; HIDER, R. C. Honeybee venom. **Bee World**, Bucks, v.68, p.57-71, 1987.

ENGH, R. A.; HUBER, R. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. **Acta Crystallographica**, v. A47, p. 392-400, 1991.

EVAN PW. Venom allergy. **BMJ**, v.316, n. 7141,p.1365-8, 1998.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. **Desenvolvendo Bioinformática**. Rio de Janeiro: Campus, p.179-180, 2001.

GRAAF, D.C.; AERTS, M.; DANNEELS, E. ; DEVREESE, B., Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy, **J Proteomics**, v.72, p. 145–154, 2009.

GUARNERI, F.; GUARNERI, C.; GUARNERI, B.; BENYENGA, S. In silico identification of potential new latex allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v.36, n.7, p.916-919, 2006.

HARVES AD, MILLIKAN LE. Current concepts of therapy and pathophysiology in arthropod bites and stings Part 2. **Insects Int J Dermatol.**; v.14, p.621–34, 1975.

HEAT SHOCK PROTEINS: Basics. On line: 2006. Disponível em: <<http://www.antigenics.com/products/tech/hsp>>. Acesso em: 06 de dezembro de 2006.

HEINE, G.; RAIDA, M.; FORSSMANN, W.G.G. Mapping of peptides and protein fragments in human urine using liquid chromatography – Mass Spectrometry. **J. of Chromatography A**, Amsterdam, v.776, p.117-124, 1997.

HERMANN, H. R. ; M. S. BLUM . Defensive mechanisms in the social Hymenoptera. In: Hermann HR, editor. **Social Insects**, vol. II, pp. 78–198. New York: Academic Press, 1981.

HERMANN, H. R., Sting autotomy, a defensive mechanism in certain social Hymenoptera. **Insects Soc.**, Paris,v.18, n.2, p.111-120,1971.

HO, C. L., HWANG, L. L., CHEN, C. T. Edema-inducing activity of a lethal protein with phospholipase A1 activity isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon**, v.31, p.605-16, 1993.

HO, C.L.; CHEN, W.C.; LIN, Y.L. Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the blackbellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon**. v.36, p.609–17, 1998.

HOFFMAN, D.R. Allergens in Hymenoptera venom XV: The immunologic basis of vespid venom cross-reactivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.75, p.611-613, 1985.

HOFFMAN, D.R. Allergens in Hymenoptera Venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.91, p.71-78, 1993.

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

HOPPE, S.; STEINHART, H.; PASCHKE, A. Identification of a 28 kDa lychee allergen as a triose-phosphate isomerase. **Food and Agricultural Immunology**, V.17, N. 1, p. 9-19, 2006.

ITO, T. et al. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 97, p. 1143-1147, 2000.

JEONG, H.; RHIM, T.; AHN, MH.; YOON, PO.; KIM, SH.; CHUNG, IY.; UH, S.; KIM, SI.; PARK, CS. Proteomic analysis of differently expressed proteins in a mouse model for allergic asthma. *J Korean Med Sci, Korea*, v.20, p. 579-585, 2003.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n.12, p. 2577-2637, 1983.

KEARSLEY, S. K. On the orthogonal transformation used for structural comparisons. **Acta Crystallographica**, v. 45A, p. 208-210, 1989.

KERKIS A, KERKIS I, RÁDIS-BAPTISTA G, OLIVEIRA EB, VIANNA-MORGANTE AM, PEREIRA LV, YAMANE T. Crotonin is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **FASEB J.**, v.18(12), p.1407-9, 2004

KOEHL, P.; LEVITT, M. A brighter future for protein structure prediction. **Nature Structural Biology**, v. 6, p. 180-111, 1999.

KUBELKA, V.; ALTMANN, F.; MARZ, L. The asparagine-linked carbohydrate of honeybee venom hyaluronidase. **Glycoconjugate Journal**, Hampshire, v.12, n.1, p.77-83, 1995.

KING, T.P.; LU, G.; GOZALEZ, M.; QIAN, N.F.; 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.

KUKUK, P. F., G. C. EICKWORT, M. RAVERT-RICHTER, B. ALEXANDER, R. GIBSON, R. A. MORSE AND F. RATNIEKS. Importance of the sting in the evolution of sociality in the Hymenoptera. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v.82, p.1-5, 1989.

LASKOWSKI, R. A., et al; PROCHECK - A program to check the stereochemical quality of protein structures, **J. Appl. Cryst.** v.26, p.283–291, 1993.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; SMITH, D. K.; JONES, D. T.; HUTCHINSON, E. G.; MORRIS, A. L.; NAYLOR, D.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK v. 3.0: **Program to check the stereochemistry quality of protein structures** – Operating instructions. [S.l:s.n.], 1994.

LESK, A. M. **Introduction to Protein Architecture**. Oxford: Oxford University Press, 2001.

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.

LE MAO, J.; MAYER, C.E; PELTRE, G.; DESVAUX, F. X.; DAVID, B.; WEYER, A.; SÉNÉCHAL, H. Mapping of Dermatophagoides farinae mite allergens by two-dimensional immunoblotting. **The Journal of allergy and clinical immunology**. v.102, p.631-6, 1998.

LU, G.K.L.; KING, T.P. Sequence identity and antigenic crossreactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.270, p.4457-4465, 1995.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three dimensional profiles. **Nature**, v. 356, p. 83-85, 1992.

MANZOLI-PALMA MF. **Defesa da colônia, autotomia, morfologia comparativa do ferrão e suas implicações em Hymenoptera: Vespidae**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências: 133p. [Tese - Doutorado], 1993.

MARTI-RENO, M. A.; STUART, A. C.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; ŠALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, v. 29, p. 291–325, 2000.

McNAIRY, M.M.; GASTMEYER, J.; PANTERA, B.; HOFFMAN, D.R. Isolation of paper wasp venom proteases by affinity chromatography. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.105, p.S57, 2000.

MORRIS, A. L.; MACARTHUR, M. W.; HUTCHINSON, E. G.; *et al.* Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, v.12, p.345-364, 1992.

MOSELEY, P. STRESS PROTEINS AND THE IMMUNE RESPONSE. **IMMUNOPHARMACOLOGY**, NEW YORK, v.48, p.299-302, 2002.

NAIR, B.C.; NAIR, C.; DENNE, B.A.S.; WYPYCH, J.; ARBESMAN, C.E.; ELLIOT, W.B. Immunologic comparison of phospholipases A present in Hymenoptera insect venoms. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v 58, 101-109, 1976.

NITTNER-MARSZALSHA, M.; LIEBHAT, J.; LIEBHAT, E.; DOR, A.; DOBEK, R.; OBOJSKI, A.; MEDRALA, W. 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.

NOCELLI, R.C.F. Glândula de veneno, P.151-163. IN C. CRUZ-LANDIM & F.C. ABDALLA (EDS.), Glândulas exócrinas das abelhas, FUNPEC-RP, Ribeirão Preto, 181p, 2002.

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

O'NEIL, S.E.; HEINRICH, T.K.; HALES, B.J, HAZELL, L.A; HOLT, D.C, FISCHER, K., THOMAS, W.R. The chitinase allergens Der p 15 and Der p 18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clin Exp Allergy**, v.36, n.6, p.831-9, 2006.

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

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, New York, v.405, p.837-846, 2000.

PANTERA, B.; HOFFMAN, D.R.; CARESI, 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.1623, p.72-81, 2003.

PARK R. **Bee and Hymenoptera stings**. Medicine [serial online]. August 21: [1 screen]. Available from: <http://emedicine.com/emerg/topic55.html>, 2006.

PAWSON, T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. **Eur. J. Cancer Suppl** , v.5, p. 3-10, 2002.

PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; GRAAF, D.; DEVREESE, B.; BEEUMEN, J.V.; JACOBS, F.J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1752, p.1-5, 2005.

PEIREN, N; DE GRAAF, D.C.; VANROBAEYS, F.; DANNEELS, E.L.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; JACOBS, F.J. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. **Toxicon**, v.52, n.1, p. 72-83, 2008.

PIEK T. Neurotoxins of the Hymenoptera: twenty-five years of research in Amsterdam. **Comp. Biochem. Physiol.** v.96C, p.223–33, 1990.

PLEBANI, M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.357, p.113-122, 2005.

PORTARO, F.C.; HAYASHI, M.A.; DE ARAUZ, L.J.; PALMA, M.S.; ASSAKURA, M.T.; SILVA, C.L.; DE CAMARGO, A.C. The Mycobacterium leprae hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the M. leprae hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HslVU protease. **Biochemistry**, New York, v.41, n.23, p.7400- 7406, 2002.

POSCH A.; CHEN Z. ; WHEELER C.; DUNN M. J.; RAULF-HEIMSOTH M.; BAUR X. **Journal of allergy and clinical immunology**. V. 99, n.3, p. 385-395, 1997.

RAIN, J.C.; SELIG, L.; DE REUSE, H.; BATTAGLIA, V.; REVERDY, C.; SIMON, S.; LENZEN, G.; PETEL, F.; WOJCIK, J.; SCHACHTER, V.; CHEMAMA, Y.; LABIGNE, A.; LEGRAIN, P. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 409, p. 211-215, 2001.

RAMACHANDRAN, G.N. Protein Structure and Crystallography. **Science**, Washington, v.141, n.357, p.288-291, 1963.

REESE, G.; AYUSO, R.; LEHER, S.B. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, Copenhagen, v.119, p.247-258, 1999.

REGULA, J.T.; UEBERLE, B.; BOGUTH, G.; GORG, A.; SCHNOLZER, M.; HERRMANN, R.; FRANK, R. Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. **Electrophoresis**, v 21, p 3765-3780, 2000.

RESING, K.A.; AHN, N.G. Applications of mass spectrometry to signal transduction. **Progr. Biophys. Mol. Biology**, Elmsford, v.71, p.501-523, 1999.

RATHMAYER, W. Venoms of Sphecidae, Pompilidae, Mutillidae, and Bethyidae. pp. 661-690 in: Bettini, S., ed., Athropod Venoms, **Handbuch der experimentellen Pharmakologie**, V. 48, Springer-Verlag, Berlin, 1978.

SALI, A. & BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v.234, p.779-815, 1993.

SANCHEZ, R.; ŠALI, A. Advances in comparative protein-structure modeling. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p. 206-214, 1997.

SANCHEZ, R. & SALI, A. Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.13597-13602, 1998.

SANTOS, K.S.; SANTOS, L.D.; MENDES, M.A.; SOUZA, B.M.; MALASPINA, O.; PALMA, M.S. Profiling the proteome complemento f the secretion form hypopharungeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.35, p.85-91, 2005.

SANTOS, L.D. **Caracterização Molecular dos Antígenos Imunodominantes do veneno da vespa social *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae)**. Tese de Doutorado (Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

SATO, O.; KUNIKATA, T.; KOHNO, K.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Characterization of Royal Jelly Proteins in both Africanized and European Honeybees (*Apis mellifera*) by Two Dimensional Gel Electrophoresis. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.52, p.5-20, 2004.

SCHMIDT, J. O.; BLUM, M. A.; OVERAL, W. L. Comparative lethality of venom from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, v.18, p.469-475, 1980.

SCHMIDT, J.O. Allergy to Hymenoptera venoms. In: PIEK, T. (ed.) Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioral aspects. **Academic Press, London**, p.509-546, 1986.

SCHMIDT, J.O. **Hymenopteran Venoms: Striving Toward the Ultimate Defense Against Vertebrates**. In: Insect Defenses, Adaptive Mechanisms and Strategies of

Prey and Predators (Evans D.L. & Schmidt, J.O., Ed's.). State Univ. of New York Press, Albany, p. 387-419, 1990.

SCHONLEBEN S.; SICKMANN A.; MUELLER M.J.; REINDERS J.. Proteome analysis of Apis mellifera royal jelly, **Anal Bioanal Chem.** V. 389, n.4, p. 1087–1093, 2007.

SCHUMACHER, M.J; EGEN, N.B. Significance of Africanized bees for public health. **Arch Intern Med.**; v.155, p.2038–43,1995.

SIYAVASH, H.; LOPES, M.; NORRIS, K.; HEBERT, C.; NIKITAKIS, N.; SAUK, J.J. Inhibition of cysteine proteinases by autolytic digestion is mediated by CBP2/Hsp47. **Connect Tissue Research**, New York, v.43, p.589-594, 2002.

SCHWIETERS, C. D. et al. The Xplor-NIH NMR Molecular Structure Determination Package. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 160, p. 66-74, 2003.

SILVEIRA, O. T. **Morfologia comparada das glândulas associadas ao aparelho de ferrão de algumas espécies de vespas (Hymenoptera: Vespidae).** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Pós-graduação em Zoologia, Unesp, Rio Claro, SP, 98p., 1990.

SMITH, E. L., HILL, R. L., LEHMAN, I. R., LEFKOWITZ, R. J., HANDLER, P. & WHITE, A. Metabolismo dos aminoácidos III. In: **Bioquímica: Aspectos Gerais**, 7ª. Guanabara Koogan, p. 587-589, 1985.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the Honeybee.** Ithaca, Comstock Publishing Associates,1956.

STARR CK. Enabling mechanisms in the origin of sociality in the Hymenoptera - The sting is the thing. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.78, p.836-9, 1985.

STARR CK. In Reply, is the sting the thing? **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.82, p.6-8., 1989.

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

TANG, V.W. Proteomic and bioinformatic analysis of epithelial tight junction reveals an unexpected cluster of synaptic molecules. **BioMed Central**, England, v.1, p 37, 2006.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22 4673-4680, 1994.

TUGMON, C.R.; TILLINGHAST, E.K. Proteases and protease inhibitors of the spider *Argiope aurantia* (Araneae, Araneidae). **Naturwissenschaften**, Abhandlungen, v.82 (4), p. 195-197, 1995.

WALHOUT, A. J. M. et al. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved vulval development. **Science**, v. 287, p.116-122, 2000.

WEINSTOCK, G.M.; ROBISON, G.E. and The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*., *Nature*, New york, v.433, p.931-949, 2006.

WIESE, M.D.; CHATAWAY, T.K.; DAVIES, N.W.; MILNE, R.W.; BROWN, S.G.A.; GAI, W.; HEDDLE, R.J. Proteomic analysis of *Myrmecia pilosula* (jack jumper) ant venom. **Toxicon**, Elmsford, v.47, p.208-217, 2006.

WILKINS, M.R.; WILLIAMS, K.L. APPEL, R.D.; HOCHSTRASSER, D.F. editors. Proteome research: new frontiers in functional genomics. **Springer**, Berlin, p.243, 1997.

WINNINGHAM, K.M.; FITCH, C.D.; SCHMIDT, M.; HOFFMAN, D.R. Hymenoptera Venom Protease Allergens. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.114, p.928-933, 2004.

WINSTON M.L. The Africanized "killer" bee: biology and public health. **Q J Med.**; v.87, p.263-67, 1994.

YATES JR. Mass spectrometry: from genomics to proteomics. **Trends Genet**, v.16, p. 5-8, 2000.

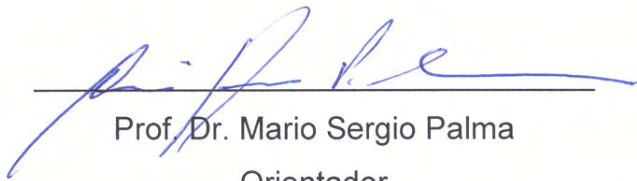
YSHII, L. M. ; SOUZA, G. H. M. F. ; CAMARGO, E. A. ; EBERLIN, M. N. ; RIBELA, M. T. P. ; MUSCARA, M. N. ; HYSLOP, S. ; COSTA, S. K. P. . Characterization of the mechanisms underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. **Toxicon**, v. 53, p. 42-52, 2008.

YU, C.J.; LIN, Y.F.; CHIANG, B.L.; CHOW L.P. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. **J. Immunol.**, Baltimore, v.170, n.1, p.445-453, 2003.

Nathalia Baptista Dias

Nathalia Baptista Dias

Orientado



Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Orientador